

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Química Analítica**



**TESIS DOCTORAL**

**Taxonomía de levaduras de origen enológico por  
espectrometría de masas**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Cristina Gutiérrez López**

**Directores**

**Luis María Polo Díez  
Nour Kayali Sayadi  
Antonio Santos de la Sen.**

**Madrid 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Química Analítica**



**TESIS DOCTORAL**

**Taxonomía de levaduras de origen  
enológico por espectrometría de masas**

**AUTOR**

Cristina Gutiérrez López

Madrid, 2015



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Química Analítica**



## **TESIS DOCTORAL**

**Taxonomía de levaduras de origen  
enológico por espectrometría de masas**

### **AUTOR**

Cristina Gutiérrez López

### **DIRECTORES**

Dr. Luis María Polo Diez

Dr. Nour Kayali Sayadi

Dr. Antonio Santos de la Sen

Madrid, 2015







A mis Padres  
y Hermano

*“Cuanto más fuerte es el obstáculo,  
más grande es la gloria que podremos alcanzar al vencerlo”*

(Molière)



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no vería la luz sin la ayuda y colaboración de muchas personas que me han acompañado en el día a día en las diferentes etapas del mismo. Todas ellas merecen unas palabras de reconocimiento.

Al profesor Dr. Luis María Polo Diez, director de este trabajo, por toda la sabiduría que me ha transmitido desde que le conozco, por la paciencia que ha tenido conmigo y por sus ánimos constantes para que este trabajo llegase a su fin; además, quisiera resaltar su cercanía personal. Me enorgullece que su carrera profesional llegue a su fin con la lectura de mi tesis.

Al Dr. Nour Kayali, también director de esta tesis, por todo el tiempo que ha dedicado a instruirme diariamente, desde el punto de vista práctico y teórico y por su aporte en el enriquecimiento de mis conocimientos con sus experiencias en el mundo científico.

En tercer lugar y no por ello menos importante, agradecer al profesor Dr. Antonio Santos de la Sen, también director de esta tesis; gracias a él he podido llevar a cabo este trabajo, en el que se unen mis raíces como bióloga y mi trabajo actual en química analítica. Resaltar la enorme disponibilidad que siempre ha tenido conmigo y el haberme transmitido su pasión por la investigación y su efectiva forma de trabajo.

A la profesora Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Gómez Flechoso, del Departamento de Matemática Aplicada de la facultad de Biología de la UCM, por su cercanía y colaboración en esta tesis, en todo lo relacionado con la elaboración de un programa estadístico para el tratamiento de datos, así como al profesor Dr. Nicolás Cardiel López del Departamento de Física de la Tierra, Astronomía y Astrofísica II de la facultad de Ciencias Físicas de la UCM.

A las Bodegas Emilio Moro, Pago de Carraovejas, Ossian y Gordonzello, por la colaboración para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Amparo, John, Albert, Alex, Javi y en especial a Nacho, por su apoyo en la formación en todo lo relacionado con el área biológica; gracias a todos, juntos hemos seguido caminos paralelos buscando el mismo objetivo; vuestro apoyo, ánimo y sacrificio constante han sido muy importantes para mí.

A todos mis AMIGOS, a los de siempre y a los más recientes, por sus halagos, mensajes de cariño, su preocupación constante por mi y admiración por todo lo que hago. Gracias a Paloma, Cris, Nuri, Fer, Bea, Nuria, Juan, Alicia, Luis, Elda y en particular a Beatriz, que me ha ayudado en los momentos finales en la organización de esta memoria. En especial, muchas gracias a María, que ha dedicado todo su tiempo en ayudarme en la maquetación final del trabajo, os quiero a todos, cada uno habéis aportado un pedacito en este trabajo. Vosotros habéis hecho que el largo camino hasta aquí fuera mucho más ameno y llevadero. Quisiera también agradecer a mi gatita Cloe las horas infinitas que me ha acompañado escribiendo, gracias a su compañía todo ha sido más fácil.

Finalmente, gracias a mis Padres, por haberme inculcado la importancia del estudio y una buena formación, lo que soy es gracias a ellos. A mi hermano y a mi abuela, por su apoyo incondicional y paciencia infinita, los cuatro me han apoyado y animado en todo momento a lo largo del camino para conseguir que este trabajo se haga realidad haciéndome ver siempre que querer es poder y que nada se disfruta tanto como lo que se consigue con esfuerzo y trabajo.

# ÍNDICE







# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>XI</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>XV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XXXI</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>XXXV</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Estudio de la diversidad de levaduras a lo largo de la historia</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Sistemática y filogenia de las levaduras. Métodos clásicos y moleculares de identificación de levaduras a nivel de género y especie</b>	<b>4</b>
1.2.1. Métodos convencionales de identificación de levaduras	4
1.2.2. Identificación molecular de levaduras	5
1.2.2.1. Secuenciación de la región D1/D2 para la identificación de levaduras	6
1.2.2.2. Identificación de levaduras mediante la técnica del RFLP	9
1.2.2.3. Identificación de levaduras mediante la técnica del AFLP	10
1.2.2.4. Identificación de levaduras mediante la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)	11
1.2.2.5. Cariotipado o separación de cromosomas.	12
1.2.2.6. Microsatélites	13
1.2.2.7. Secuencias delta	13
<b>1.3. Microbiología del vino</b>	<b>13</b>
1.3.1. Microorganismos implicados en la elaboración del vino	14
1.3.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.3.1.2. no- <i>Saccharomyces</i>	19
1.3.2. Sucesión de especies de levadura desde la uva al vino	20
1.3.3. Tipificación, identificación, y taxonomía microbiana	22
<b>1.4. Aspectos esenciales de la Espectrometría de masas (MS)</b>	<b>23</b>
1.4.1. Breve reseña histórica de la MS	23

1.4.2. Fundamentos	25
1.4.3. Analizadores	26
1.4.3.1. Tiempo de vuelo (TOF)	26
1.4.3.1.1. Fundamentos básicos	26
1.4.3.1.2. Ecuaciones del movimiento del TOF	27
1.4.3.1.3. Resolución	28
1.4.3.1.4. Modo lineal y reflectrón	28
1.4.3.1.5. Modo positivo y negativo	29
1.4.3.2. Mención de otros analizadores: Cuadrupolo (Q), Trampa de iones (IT), Transformada de Fourier (FT)	29
<b>1.5. MALDI-TOF MS</b>	<b>29</b>
1.5.1. Preparación de muestra	30
1.5.2. Matrices	30
1.5.3. Placas MALDI	31
1.5.4. Calibrantes	32
1.5.5. Librerías de espectros de masas	32
1.5.6. Equipamientos basados en espectrometría de masas MALDI-TOF para el análisis de microorganismos	33
1.5.7. Ventajas, limitaciones y futuras aplicaciones en MALDI-TOF MS	35
<b>1.6. La Espectrometría de masas, MALDI TOF, aplicada a la caracterización, clasificación e identificación de microorganismos basada en su perfil proteico: PROTEÓMICA</b>	<b>36</b>
<b>1.7. Antecedentes bibliográficos del análisis, identificación y clasificación de microorganismos por espectrometría de masas</b>	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Bodegas y Denominaciones de Origen (D.O.) para la toma de muestra</b>	<b>49</b>
3.1.1. Denominación de origen Ribera del Duero	49
3.1.1.1. Emilio Moro, en Pesquera de Duero	49

3.1.1.2. Pago de Carraovejas, en Peñafiel	50
3.1.2. Denominación de Origen Rueda	50
3.1.2.1. Ossian, en Nieva	51
3.1.3. Denominación de Origen Tierra de León	51
3.1.3.1. Bodegas Gordonzello S.A., en Gordoncillo	52
<b>3.2. Muestras de levaduras</b>	<b>52</b>
3.2.1. Aislamiento y selección	52
3.2.1.1. Cepas género <i>Saccharomyces</i>	53
3.2.1.2. Cepas género no- <i>Saccharomyces</i>	59
3.2.2. Mantenimiento	64
<b>3.3. Medios de cultivo, tampones, disoluciones, reactivos y cepas tipo</b>	<b>64</b>
3.3.1. Medios de cultivo	64
3.3.1.1. Medio base YMA ( <i>Yeast Malt Agar</i> )	64
3.3.1.2. Agar Sabouraud-Cloranfenicol-Rosa de Bengala	65
3.3.1.3. Medio de crioconservación	65
3.3.1.4. YPD ( <i>Yeast Proteose Peptone Dextrose</i> )	65
3.3.1.5. Medio de lisina	66
3.3.2. Tampones, disoluciones, reactivos y cepas tipo	66
3.3.3. Equipos y material auxiliar utilizado	69
3.3.4. Librería de espectros de masas MALDI-TOF MS	70
<b>3.4. Procedimientos</b>	<b>71</b>
3.4.1. Técnicas biológicas	71
3.4.1.1. Identificación molecular intraespecífica de levaduras en <i>S. cerevisiae</i> : estudio de polimorfismos de las regiones interdelta.	71
3.4.1.1.1. Extracción del ADN	71
3.4.1.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	72
3.4.1.1.3. Electroforesis en geles de agarosa	73
3.4.1.2. Identificación molecular de levaduras a nivel de especie: Secuenciación de la región D1/D2	73
3.4.1.2.1. Extracción del ADN	73

3.4.1.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	74
3.4.1.2.3. Purificación del producto de PCR	74
3.4.1.2.4. Secuenciación de la región de ADN amplificada e identificación	75
3.4.2. Técnica espectrometría de masas MALDI-TOF MS	75
3.4.2.1 Selección de cepas de levadura	75
3.4.2.2. Preparación de muestra	76
3.4.2.2.1. Crecimiento de la levadura	76
3.4.2.2.2. Preparación de disoluciones para la extracción de proteínas y otras disoluciones	76
3.4.2.2.3. Extracción de proteínas	77
3.4.2.3. Preparación de la placa MALDI Anchorchip	78
3.4.2.4. Adquisición de espectros de masas	79
3.4.2.5. Procesamiento y calibración de los espectros de masas	79
3.4.2.6. Creación de librería de espectros de masas	80
3.4.2.6.1. Empleo de un programa estadístico en lenguaje de programación R para la detección de líneas (iones) representativas del espectro de masas.	80
3.4.2.6.2. Empleo de un programa desarrollado en lenguaje FORTRAN para generar espectros de masas sintéticos de cada cepa de levadura	82
3.4.2.7. Validación de librería	82
3.4.2.8. Identificación de muestras de cepa de levaduras	83
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>87</b>
<b>4.1. Técnicas biológicas</b>	<b>87</b>
4.1.1. Aislamiento y selección de levaduras	87
4.1.2. Identificación molecular intraespecífica de levaduras en <i>S. cerevisiae</i> : estudio de polimorfismos de las regiones interdelta	91
4.1.3. Identificación molecular de levaduras a nivel de especie: Secuenciación de la región D1/D2	105
4.1.3.1. Secuenciación de la región de ADN amplificada e identificación	105
<b>4.2. Técnica espectrometría de masas MALDI-TOF MS</b>	<b>109</b>

4.2.1. Optimización de la preparación muestra para análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF MS	109
4.2.1.1. Tipo de placa MALDI	114
4.2.1.2. Naturaleza de la matriz	114
4.2.1.3. Muestra	115
4.2.1.3.1. Cantidad de muestra	115
4.2.1.3.2. Naturaleza y concentración del ácido	118
4.2.1.3.3. Relación AcF:ACN	120
4.2.1.3.4. Cantidad de AcF y ACN con relación 1:1	121
4.2.1.3.5. Efecto de la forma de adición de la mezcla AcF:ACN sobre la muestra	125
4.2.1.4. Estudios sobre la matriz y disolución orgánica (OS)	127
4.2.1.4.1. Estabilidad de la matriz y OS	127
4.2.1.4.2. Efecto de la variación del porcentaje de ACN en la disolución OS	129
4.2.1.4.3. Efecto de la variación del porcentaje de TFA en la disolución OS	131
4.2.1.4.4. Efecto de la variación simultánea del porcentaje de ACN y TFA en la disolución OS	134
4.2.1.4.5. Efecto de la dilución y cantidad de matriz	136
4.2.1.4.6. Volúmenes de muestra y matriz añadidos	138
4.2.1.4.7. Efecto sándwich matriz-muestra-matriz	138
4.2.1.4.8. Efecto del modo de depositar muestra-matriz	141
4.2.1.4.9. Estudios al microscopio	143
4.2.1.4.10. Desarrollo del procedimiento propuesto MALDI-TOF MS	146
4.2.2. Creación de librería de espectros de masas de cepas vínicas mediante análisis por MALDI-TOF MS	147
4.2.2.1. Análisis de cepas del género <i>Saccharomyces</i> , especie <i>S. cerevisiae</i> . Diferenciación a nivel de cepa.	147
4.2.2.2. Análisis de cepas de géneros no- <i>Saccharomyces</i> . Diferenciación a nivel de especie y cepa.	158
4.2.2.2.1. Inclusión de espectros de masas sintéticos en librería	159

4.2.2.2. Estudio de los espectros de masas de cepas vínicas incluidos en la librería	161
4.2.2.2.1. Cepas especie <i>Aureobasidium pullulans</i>	161
4.2.2.2.2. Cepas especie <i>Cryptococcus amylo lentus</i>	164
4.2.2.2.3. Cepas de géneros <i>Hanseniaspora</i>	169
4.2.2.2.3.1. Cepas especie <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	170
4.2.2.2.3.2. Cepas especie <i>Hanseniaspora osmophila</i>	171
4.2.2.2.3.3. Cepas especie <i>Hanseniaspora uvarum</i>	174
4.2.2.2.4. Cepas especie <i>Kluyveromyces marxianus</i>	178
4.2.2.2.5. Cepas especie <i>Lachancea thermotolerans</i>	179
4.2.2.2.6. Cepas del g�nero <i>Metschnikowia</i>	180
4.2.2.2.6.1. Cepas especie <i>Metschnikowia fructicola</i>	181
4.2.2.2.6.2. Cepas especie <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	181
4.2.2.2.6.3. Cepas especie <i>Metschnikowia viticola</i>	181
4.2.2.2.7. Cepas especie <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	183
4.2.2.2.8. Cepas especie <i>Rhodospiridium toruloides</i>	184
4.2.2.2.9. Cepas especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	185
4.2.2.2.10. Cepas especie <i>Torulaspora delbrueckii</i>	190
4.2.2.2.11. Cepas especie <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	192
4.2.2.2.12. Cepas especie <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	195
4.2.3. Validaci�n de la librería	197
4.2.4. Diferenciaci�n e identificaci�n de dos especies del género <i>Metschnikowia</i> . Especies <i>M. fructicola</i> y <i>M. pulcherrima</i>	202
4.2.4.1. Análisis de cepas TIPO de <i>M. fructicola</i> y <i>M. pulcherrima</i>	203
4.2.4.2. Comparación de cepas autóctonas de muestra con cepas Tipo	206
4.2.4.2.1. <i>M. fructicola</i>	206
4.2.4.2.2. <i>M. pulcherrima</i>	211
4.2.5. Optimización de variables a considerar en el programa estadístico para crear librería de espectros de masas de cepas de levaduras vínicas	217
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES</b>	<b>229</b>

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>235</b>
<b>ANEXO I: Espectros de masas de cepas vínicas de la especie <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>255</b>
<b>ANEXO II: Espectros de masas de cepas vínicas de especies de géneros no- <i>Saccharomyces</i></b>	<b>283</b>
<b>ANEXO III: Espectros de masas sintéticos de cepas vínicas de las especies <i>M.</i> <i>pulcherrima</i> y <i>M. fructicola</i></b>	<b>317</b>
<b>ANEXO IV: Espectros de masas sintéticos de cepas vínicas de especies de géneros no- <i>Saccharomyces</i></b>	<b>323</b>
<b>ANEXO V: Validación de la librería. Espectros de masas</b>	<b>329</b>





## ABREVIATURAS

2,5-DHB	Ácido 2,5-dihidroxi-benzoico
2D-DIGE	Electroforesis diferencial en gel
3-HPA	Ácido 3-hidroxipicolínico
AcF	Ácido fórmico
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphisms</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BTS	<i>Bacterial Test Standard</i>
C	Citosina
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CECT	Colección española de cultivos tipo
CMBT	5-Cl-2-mercaptopbenzotizol
D.O.	Denominación de Origen
e	Electrón
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
ESI	Electrospray
EtOH	Etanol
FT	Transformada de Fourier
FTICR	Transformada de Fourier de resonancia ciclotrón de iones
G	Guanina
GC	Cromatografía de Gases
HCCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico
ICAT	Marcaje isotópico diferencial
ICR	Ion Ciclotrón
IT	Trampa de iones
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers</i>
LCMS	Cromatografía líquida/espectrometría de masas
m	Masa
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MS	Espectrometría de Masas
	Tecnología de identificación de proteínas
MudPIT	Multidimensional
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OS	Solvente orgánico

PAC	Placa AnchorChip pre-manchado
PAPDs	<i>Microsatellite-primed</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Q	Cuadрупolo
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar - <i>Randomly amplified polymorphic</i>
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphisms</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SA	Ácido sinápinico
SNR	Relación señal/ruido
sp	Especie
t	Tiempo
TAE	tris acetato EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Tiempo de vuelo
UV	Ultravioleta
v	Velocidad
V	Potencial
YMA	Yeast Malt Agar
YPD	Yeast Proteose Peptone Dextrose
CMBT	5-Cl-2-mercaptobenzotizol
SIL	Sistema informático del laboratorio
z	nº de cargas

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales especies levaduras relacionadas con la uva y el vino (Carrau, 2005)	15
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Tabla 3. Comparación de (Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure)	34
Tabla 4. Bibliografía más relevante en el área de identificación y clasificación de microorganismos	39
Tabla 5. Listado de 98 cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> seleccionadas para su análisis mediante MALDI-TOF MS y 224 polimorfismos detectados	54
Tabla 6. Listado de 118 cepas no- <i>Saccharomyces</i> seleccionadas para su análisis mediante MALDI-TOF MS	60
Tabla 7. Masas de referencia del BTS	80
Tabla 8. Listado de cepas no- <i>Saccharomyces</i> secuenciadas e identificadas y su número de acceso en el GenBank.	105
Tabla 9. Variables estudiadas en la optimización	112
Tabla 10. Optimización de la cantidad de muestra	116
Tabla 11. Optimización de la concentración del AcF	119
Tabla 12. Optimización de la cantidad de AcF:ACN en la relación 1:1 para 1 mg de muestra	122
Tabla 13. Optimización de la cantidad de AcF:ACN en la relación 1:1 para 3 mg de muestra	123
Tabla 14. Optimización de la forma de adición de la mezcla AcF:ACN sobre la muestra	126
Tabla 15. Estudio de la estabilidad de la matriz y OS	128
Tabla 16. Optimización del porcentaje de ACN en la disolución OS	130
Tabla 17. Optimización del porcentaje de TFA en la disolución OS	132
Tabla 18. Estudio de la variación simultánea del porcentaje de ACN y TFA en la disolución OS.	135
Tabla 19. Estudio de la dilución de la matriz	137
Tabla 20. Estudio del efecto sándwich matriz-muestra-matriz	140
Tabla 21. Estudio del efecto en el modo de depositar muestra-matriz	142
Tabla 22. Identificación de la cepa S-EM-314 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	148
Tabla 23. Identificación de la cepa S-G-37 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	148
Tabla 24. Identificación de la cepa S-G-45 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	149
Tabla 25. Identificación de la cepa S-G-5 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	149
Tabla 26. Identificación de la cepa S-G-89 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	149
Tabla 27. Identificación de la cepa S-G-113 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	150
Tabla 28. Identificación de la cepa S-EM-125 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	150
Tabla 29. Identificación de la cepa S-EM-107 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	150
Tabla 30. Identificación de la cepa S-EM-240 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	151

Tabla 31. Identificación de la cepa S-EM-261 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	151
Tabla 32. Identificación de la cepa S-EM-302 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	151
Tabla 33. Identificación de la cepa S-EM-181 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	152
Tabla 34. Identificación de la cepa S-EM-341 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	152
Tabla 35. Identificación de la cepa S-O-21 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	152
Tabla 36. Identificación de la cepa S-O-47 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	153
Tabla 37. Identificación de la cepa S-O-64 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	153
Tabla 38. Identificación de la cepa S-O-14 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	153
Tabla 39. Identificación de la cepa S-O-302 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	154
Tabla 40. Identificación de la cepa S-O-323 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	154
Tabla 41. Identificación de la cepa S-O-275 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	154
Tabla 42. Identificación de la cepa S-O-285 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	155
Tabla 43. Identificación de la cepa S-EM-113 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	155
Tabla 44. Identificación de la cepa S-EM-352 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	156
Tabla 45. Identificación de la cepa S-EM-310 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	156
Tabla 46. Identificación de la cepa S-EM-266 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	156
Tabla 47. Identificación de la cepa NS-O-70 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	163
Tabla 48. Identificación de la cepa NS-PDC-129 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	163
Tabla 49. Identificación de la cepa NS-PDC-134 y porcentaje de similitud con cepas de la librería	163
Tabla 50. Identificación de la cepa NS-PDC-132 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	165
Tabla 51. Identificación de la cepa NS-PDC-178 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	166
Tabla 52. Identificación de la cepa NS-PDC-243 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	166
Tabla 53. Identificación de la cepa NS-PDC-248 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	166
Tabla 54. Identificación de la cepa NS-PDC-249 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	167
Tabla 55. Identificación de la cepa NS-PDC-254 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	167
Tabla 56. Identificación de la cepa NS-PDC-257 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	167
Tabla 57. Identificación de la cepa NS-PDC-261 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	168
Tabla 58. Identificación de la cepa NS-PDC-262 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	168
Tabla 59. Identificación de la cepa S-EM-PR-352 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	168
Tabla 60. Identificación de la cepa S-EM-LM-113 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	169
Tabla 61. Identificación de la cepa NS-G-15 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	171
Tabla 62. Identificación de la cepa NS-G-4 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	171
Tabla 63. Identificación de la cepa NS-G-33 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	173
Tabla 64. Identificación de la cepa NS-G-35 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	173
Tabla 65. Identificación de la cepa NS-G-49 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	173
Tabla 66. Identificación de la cepa NS-O-120 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	176

Tabla 67. Identificación de la cepa NS-EM-CV-1 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	177
Tabla 68. Identificación de la cepa NS-PDC-1 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	177
Tabla 69. Identificación de la cepa NS-O-1 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	177
Tabla 70. Identificación de la cepa NS-PDC-100 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	178
Tabla 71. Identificación de la cepa NS-PDC-99 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	179
Tabla 72. Identificación de la cepa NS-G-13 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	180
Tabla 73. Identificación de la cepa NS-PDC-75 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	180
Tabla 74. Identificación de la cepa NS-O-100 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	182
Tabla 75. Identificación de la cepa NS-O-32 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	182
Tabla 76. Identificación de la cepa NS-O-97 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	183
Tabla 77. Identificación de la cepa NS-G-57 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	184
Tabla 78. Identificación de la cepa NS-G-61 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	185
Tabla 79. Identificación de la cepa NS-G-70 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	185
Tabla 80. Identificación de la cepa NS-G-24 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	187
Tabla 81. Identificación de la cepa NS-G-30 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	187
Tabla 82. Identificación de la cepa NS-G-31 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	187
Tabla 83. Identificación de la cepa NS-G-37 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	188
Tabla 84. Identificación de la cepa NS-G-42 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	188
Tabla 85. Identificación de la cepa NS-G-44 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	188
Tabla 86. Identificación de la cepa NS-G-48 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	189
Tabla 87. Identificación de la cepa NS-G-50 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	189
Tabla 88. Identificación de la cepa NS-G-52 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	189
Tabla 89. Identificación de la cepa NS-G-54 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	190
Tabla 90. Identificación de la cepa NS-G-55 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	190
Tabla 91. Identificación de la cepa NS-G-27 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	191
Tabla 92. Identificación de la cepa NS-G-72 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	192
Tabla 93. Identificación de la cepa NS-PDC-169 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	192
Tabla 94. Identificación de la cepa NS-O-11 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	193
Tabla 95. Identificación de la cepa NS-O-14 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	194
Tabla 96. Identificación de la cepa NS-PDC-171 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	194
Tabla 97. Identificación de la cepa NS-PDC-167 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	194
Tabla 98. Identificación de la cepa NS-O-34 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	195
Tabla 99. Identificación de la cepa NS-G-58 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	196
Tabla 100. Identificación de la cepa NS-G-63 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería	196
Tabla 101. Cepas analizadas partiendo de nuevo crecimiento de levadura. Identificación y porcentaje de similitud	198

Tabla 102. Cepas analizadas partiendo de muestra congelada 1. Identificación y porcentaje de similitud	199
Tabla 103. Cepas analizadas partiendo de muestras congeladas 2 (diferente posición en placa MALDI). Identificación y porcentaje de similitud	200
Tabla 104. Cepas Tipo y cepas de muestra analizadas de <i>M. fructicola</i> y <i>M. pulcherrima</i>	203
Tabla 105. Porcentajes de similitud de NS-O-23 con todas las cepas de la librería.	210
Tabla 106. Porcentajes de similitud de S-EM-266 con todas las cepas de la librería	210
Tabla 107. Porcentajes de similitud de <i>M. fructicola</i> Tipo- CBS8853 con todas las cepas de la librería	211
Tabla 108. Porcentajes de similitud de NS-O-88 con todas las cepas de la librería (22 primeros y 5 últimos candidatos)	215
Tabla 109. Porcentajes de similitud de <i>M. pulcherrima</i> Tipo- CECT11202 con todas las cepas de la librería (22 primeros y 5 últimos candidatos)	216

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Esquema de las regiones del ADNr mostrando las regiones 18S, 5.8S y 26S del ARNr y la región ITS con algunos cebadores usados en las reacciones de PCR usadas para su amplificación.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2. Esquema de la estructura de las subunidades repetidas de los genes de los RNAr en S. cerevisiae .....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 3. Diagrama esquemático de la técnica RAPD .....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 4. Distinción entre Identificación y tipado.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 5. Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas. ....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 6. Espectro de masas de calibrante BTS. 20 líneas detectadas a una SNR de 11. ....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 7. Número de cepas de S. cerevisiae aisladas clasificadas por bodega y año.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 8. Número de cepas de no-Saccharomyces aisladas clasificadas por bodega y año. ....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 9. Placa Petri con crecimiento en .....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 10. Número de cepas de S. cerevisiae seleccionadas clasificadas por bodega y año.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 11 . Número de cepas de no-Saccharomyces seleccionadas clasificadas por bodega y año .....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 12. Número de especies seleccionadas pertenecientes a géneros no-Saccharomyces clasificados por bodega. ....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 13. Distribución de polimorfismos de S. cerevisiae por bodega .....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 14. Representación del número de polimorfismos detectados por bodega, año y finca. ....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 15. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 1 a la 80 de S. cerevisiae aisladas en mostos fermentados en la bodega Gordonzello. ....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 16. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 81 a la 120 de S. cerevisiae aisladas en mostos fermentados en la bodega Gordonzello.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 17. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 1 a la 80 de S. cerevisiae aisladas en mostos fermentados en la bodega Emilio Moro. ....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 18. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 81 a la 160 de S. cerevisiae aisladas en mostos fermentados en la bodega Emilio Moro. ....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 19. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 161 a la 240 de S. cerevisiae aisladas en mostos fermentados en la bodega Emilio Moro. ....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 20. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 241 a la 320 de S. cerevisiae aisladas en mostos fermentados en la bodega Emilio Moro. ....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 21. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 321 a la 380 de S. cerevisiae aisladas en mostos fermentados en la bodega Emilio Moro. ....</i>	<i>99</i>
<i>Figura 22. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 1 a la 80 de S. cerevisiae aisladas en mostos fermentados en la bodega Ossian. ....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 23. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 81 a la 160 de S. cerevisiae aisladas en mostos fermentados en la bodega Ossian. ....</i>	<i>101</i>

Figura 24. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 161 a la 240 de <i>S. cerevisiae</i> aisladas en mostos fermentados en la bodega Ossian. ....	102
Figura 25. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 241 a la 320 de <i>S. cerevisiae</i> aisladas en mostos fermentados en la bodega Ossian. ....	103
Figura 26. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 321 a la 380 de <i>S. cerevisiae</i> aisladas en mostos fermentados en la bodega Ossian. ....	104
Figura 27. Iones representativos entorno a las relaciones m/z, 6.543 Da, 8.468 Da y 11.563 Da para cantidades de muestra de 1mg (verde), 3mg (negro), 5 mg (rosa), 8 mg (rojo) .....	112
Figura 28. Espectros de masas obtenidos en la optimización de la cantidad de muestra, a) 1 mg, b) 3 mg, c) 5 mg, d) 8 mg .....	116
Figura 29. Optimización de la cantidad de muestra .....	117
Figura 30. Espectros de masas obtenidos en la optimización de la concentración del TFA, a) TFA 2%, b) TFA 20%, c) TFA 40%, d) TFA 60% .....	118
Figura 31. Espectros de masas obtenidos en la optimización de concentración del AcF, a) 60%, b)70%, c) 80%, d) 90%.....	119
Figura 32. Optimización de la concentración del AcF .....	120
Figura 33. Espectros de masas obtenidos en la optimización de la relación AcF:ACN, a) 100 $\mu$ L AcF:100 $\mu$ L ACN, b) 110 $\mu$ L AcF:90 $\mu$ L ACN y c) 120 $\mu$ L AcF:80 $\mu$ L ACN.....	121
Figura 34. Espectros de masas obtenidos en la optimización de la cantidad de AcF:ACN en la relación 1:1, a) 10 $\mu$ LAcF:10 $\mu$ LACN-1mg, b) 25 $\mu$ LAcF:25 $\mu$ LACN-1mg, c) 50 $\mu$ LAcF:50 $\mu$ LACN-1mg, d) 100 $\mu$ LAcF:100 $\mu$ LACN-1mg, e) 25 $\mu$ LAcF:25 $\mu$ LACN-3mg, f) 50 $\mu$ LAcF:50 $\mu$ LACN-3mg, g) 100 $\mu$ LAcF:100 $\mu$ LACN-3mg, h) 150 $\mu$ LAcF:150 $\mu$ LACN-3mg .....	122
Figura 35. Optimización cantidad de AcF:ACN en la relación 1:1 para 1 y 3 mg de muestra .....	124
Figura 36. Espectros de masas obtenidos en la optimización de la forma de adición de la mezcla AcF:ACN sobre la muestra, a) Matriz 2-semanas secuencial, b) Matriz nueva secuencial, c) Matriz 2-semanas MIX, d) Matriz nueva MIX .....	125
Figura 37. Optimización de la forma de adición de la mezcla AcF:ACN sobre la muestra .....	126
Figura 38. Espectros de masas obtenidos en el estudio de la estabilidad de la matriz y OS, a) Matriz 2sem., b) Matriz 1día, c) Matriz nueva, OS 2sem, d) Matriz nueva, OS nuevo.....	127
Figura 39. Estudio de la estabilidad de la matriz y OS .....	128
Figura 40. Espectros de masas obtenidos en la optimización del porcentaje de ACN en la disolución OS, a) 25%, b) 50%, c) 75%, d) 80%, e) 90% .....	129
Figura 41. Optimización del porcentaje de ACN en la disolución OS.....	131
Figura 42. Espectros de masas obtenidos en la optimización del porcentaje de TFA en la disolución OS, a) 3%, b) 2,5%, c) 1,5%, d) 0,5%, e)0,1% .....	132
Figura 43. Optimización del porcentaje de TFA en la disolución OS .....	133



Figura 44. Espectros de masas obtenidos en el estudio de la variación simultanea del porcentaje de ACN y TFA en la disolución OS, a) 25%ACN-2,5%TFA, b) 50%ACN-2,5%TFA,, c)75%ACN-2,5%TFA, d) 50%ACN-1%TFA y e) 25%ACN-5%TFA .....	134
Figura 45. Estudio de la variación simultanea del porcentaje de ACN y TFA en la disolución OS .....	135
Figura 46. Espectros de masas obtenidos en el estudio de la dilución de la matriz, a) sin dilución de matriz, b) 1µL matriz diluida, c) 2µL matriz diluida .....	136
Figura 47. Estudio de la dilución de la matriz .....	137
Figura 48. Espectros de masas obtenidos en el estudio del diferentes volúmenes de muestra-matriz, a) 2uL de muestra-1uL de matriz, b)1uL de muestra-1uL de matriz, c) 2uL de muestra-2uL de matriz.....	138
Figura 49. Espectros de masas obtenidos en el estudio del efecto sándwich matriz-muestra-matriz, a) Norma50%ACN; Placa 384, b) Normal75%ACN; Placa 384, c) Sandw50%ACN; Placa 384, d) Sand75%ACN; Placa 384, f) Normal50%ACN;PAC., g) Normal75%ACN;PAC., h) Sandw50%ACN;PAC. i) Sandw75%ACN;PAC.....	139
Figura 50. Estudio del efecto sándwich matriz-muestra-matriz .....	141
Figura 51. Espectros de masas obtenidos en el estudio del efecto en el modo de depositar muestra-matriz, a) 1µL Muestra-secar+1µLHCCA, b) 1µL Muestra-secar+1µLHCCA (Agitar con punta la matriz en el pocillo), c) MIX-secar+1µLHCCA .....	142
Figura 52. Estudio del efecto en el modo de depositar muestra-matriz .....	143
Figura 53. Vista al microscopio de un pocillo con adición previa de disolvente (isopropanol y hexano) sobre muestra-matriz .....	144
Figura 54. Vista al microscopio de .....	144
Figura 55. Vista al microscopio de un .....	144
Figura 56. Vista al microscopio de un pocillo con muestra (en ausencia de matriz).....	145
Figura 57 Vista al microscopio de un pocillo muestra-matriz sin adición posterior de gota.....	145
Figura 58. Vista al microscopio de un pocillo muestra-matriz con adición posterior de gota 100% ACN .....	145
Figura 59. Vista al microscopio de un pocillo muestra-matriz con adición posterior de gota 100% agua.....	145
Figura 60. Espectros de masas obtenidos en el estudio del efecto de la adición/no adición al conjunto muestra-matriz de una gota de diferente composición, a)75%ACN, b)50%ACN, c)25%ACN, e)100%ACN, f)100% agua .	146
Figura 61. Espectros obtenidos en la modificación de parámetros del método instrumental a), b) y c) no modificados, d) y e) modificados.....	147
Figura 62. Espectro de masas de la cepa S-EM-113.....	157
Figura 63. Espectro de masas de la cepa S-EM-352.....	157
Figura 64. Espectro de masas de la cepa S-EM-310.....	157
Figura 65. Espectro de masas de la cepa S-EM-266.....	157
Figura 66. Espectro de masas “sintético” de líneas seleccionadas incluido en la librería de espectros para <i>Hanseniaspora uvarum</i> (cepa NS-EM-1) .....	160
Figura 67. Espectros de masas de cepas de la especie <i>A. pullulans</i> .....	162

Figura 68. Espectros de masas de cepas de la especie <i>C. amyloletus</i> .....	165
Figura 69. Espectros de masas de cepas de tres especies del género <i>Hanseniaspora</i> . a) <i>H. opuntiae</i> b) <i>H. osmophila</i> c) <i>H. uvarum</i> .....	169
Figura 70. Espectros de masas de cepas de la especie <i>H. opuntiae</i> .....	170
Figura 71. Espectros de masas de cepas de la especie <i>H. osmophila</i> .....	172
Figura 72. Espectros de masas de cepas de la especie <i>H. uvarum</i> .....	175
Figura 73. Espectros de masas de cepas de la especie <i>H. uvarum</i> .....	176
Figura 74. Espectros de masas de cepas de la especie <i>K. marxianus</i> .....	178
Figura 75. Espectros de masas de cepas de la especie <i>L. thermotolerans</i> . a) total b) ampliación .....	179
Figura 76. Espectros de masas de cepas de tres especies del género <i>Metschnikowia</i> . a) <i>M. viticola</i> b) <i>M. fructicola</i> c) <i>M. pulcherrima</i> . a) total b) ampliación .....	181
Figura 77. Espectros de masas de cepas de la especie <i>M. viticola</i> . a) total b) ampliación .....	182
Figura 78. Espectro de masas de cepas NS-G-57 de la especie <i>M. guilliermondii</i> .....	183
Figura 79. Espectros de masas de cepas de la especie <i>R. toruloides</i> .....	184
Figura 80. Espectros de masas de cepas de la especie <i>S. cerevisiae</i> . a) total b) ampliación .....	186
Figura 81. Espectros de masas de cepas de la especie <i>S. cerevisiae</i> . a) total b) ampliación .....	186
Figura 82. Espectros de masas de cepas de la especie <i>T. delbrueckii</i> .....	191
Figura 83. Espectros de masas de cepas de la especie <i>W. anomalus</i> .....	193
Figura 84. Espectros de masas de cepas de la especie <i>Z. bailii</i> . a) total .....	195
Figura 85. Espectros de masas de cepas de la especie <i>Z. bailii</i> . b) ampliación .....	196
Figura 86. Comparación de los espectros de masas de <i>M. fructicola</i> Tipo- CBS8853 (a) y <i>M. pulcherrima</i> Tipo- CECT11202 (b) .....	204
Figura 87. Ampliación del espectro de masas en la zona relación $m/z$ 6800 - Comparación de los espectros de masas de <i>M. fructicola</i> (a) y <i>M. pulcherrima</i> Tipo- CECT11202 (b) .....	204
Figura 88. Ampliación del espectro de masas en la zona relación $m/z$ 3400 - Comparación de los espectros de masas de <i>M. fructicola</i> Tipo- CBS8853 (a) y <i>M. pulcherrima</i> Tipo- CECT11202 (b) .....	205
Figura 89. Espectro de masas de <i>M. fructicola</i> Tipo- CBS8853 generado por el programa R .....	205
Figura 90. Espectro de masas de <i>M. pulcherrima</i> Tipo- CECT11202 generado por el programa R .....	206
Figura 91. Comparación de espectro de masas de <i>M. fructicola</i> Tipo- CBS8853 con espectros de masas de posibles cepas de <i>M. fructicola</i> .....	207
Figura 92. Ampliación del espectro de masas en la zona de relación $m/z$ 6800 - Comparación de <i>M. fructicola</i> Tipo- CBS8853 con posibles cepas de <i>M. fructicola</i> .....	208
Figura 93. Ampliación de la zona relación $m/z$ 3400 - Comparación de <i>M. fructicola</i> Tipo- CBS8853 con posibles cepas de <i>M. fructicola</i> .....	209
Figura 94. Comparación de espectro de masas de <i>M. pulcherrima</i> Tipo- CECT11202 con espectros de masas de posibles cepas de <i>M. pulcherrima</i> .....	212

Figura 95. Ampliación de los espectros de masas en la zona relación $m/z$ 6800 - Comparación de <i>M. pulcherrima</i> Tipo- CECT11202 con posibles cepas de <i>M. pulcherrima</i> .....	213
Figura 96. Ampliación de los espectros de masas en la zona relación $m/z$ 3400 - Comparación de <i>M. pulcherrima</i> Tipo- CECT11202 con posibles cepas de <i>M. pulcherrima</i> .....	214
Figura 97. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 5 .....	218
Figura 98. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 10 .....	218
Figura 99. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 20 .....	218
Figura 100. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 50 .....	219
Figura 101. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 100 .....	219
Figura 102. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 200 .....	219
Figura 103. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 5 .....	220
Figura 104. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 10 .....	220
Figura 105. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 20 .....	220
Figura 106. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 50 .....	220
Figura 107. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 100 .....	221
Figura 108. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 200 .....	221
Figura 109. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 5 .....	221
Figura 110. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 10 .....	222
Figura 111. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 20 .....	222
Figura 112. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 50 .....	222
Figura 113. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 100 .....	222
Figura 114. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 200 .....	223
Figura 115. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 5 .....	223
Figura 116. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 10 .....	223
Figura 117. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 20 .....	224
Figura 118. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 50 .....	224
Figura 119. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 100 .....	224
Figura 120. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 200 .....	224
Figura 121. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 5 .....	225
Figura 122. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 10 .....	225
Figura 123. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 20 .....	225
Figura 124. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 50 .....	226
Figura 125. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 100 .....	226
Figura 126. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 200 .....	226
Figura 127. S-G-37. <i>S. cerevisiae</i> .....	255
Figura 128. S-G-45. <i>S. cerevisiae</i> .....	255

Figura 129. S-G-54 <i>S. cerevisiae</i> .....	255
Figura 130. S-G-57. <i>S. cerevisiae</i> .....	255
Figura 131. S-G-5. <i>S. cerevisiae</i> .....	256
Figura 132. S-G-6. <i>S. cerevisiae</i> .....	256
Figura 133. S-G-9. <i>S. cerevisiae</i> .....	256
Figura 134. S-G-12. <i>S. cerevisiae</i> .....	256
Figura 135. S-G-15. <i>S. cerevisiae</i> .....	257
Figura 136. S-G-89. <i>S. cerevisiae</i> .....	257
Figura 137. S-G-91. <i>S. cerevisiae</i> .....	257
Figura 138. S-G-113. <i>S. cerevisiae</i> .....	257
Figura 139. S-EM-125 <i>S. cerevisiae</i> .....	258
Figura 140. S-EM-127 <i>S. cerevisiae</i> .....	258
Figura 141. S-EM-107 <i>S. cerevisiae</i> .....	258
Figura 142. S-EM-109 . <i>S. cerevisiae</i> .....	258
Figura 143. S-EM-112 . <i>S. cerevisiae</i> .....	259
Figura 144. S-EM-113 . <i>S. cerevisiae</i> .....	259
Figura 145. S-EM-115 . <i>S. cerevisiae</i> .....	259
Figura 146. S-EM-114 . <i>S. cerevisiae</i> .....	259
Figura 147. S-EM-116 . <i>S. cerevisiae</i> .....	260
Figura 148. S-EM-118 . <i>S. cerevisiae</i> .....	260
Figura 149. S-EM-81 . <i>S. cerevisiae</i> .....	260
Figura 150. S-EM-82 . <i>S. cerevisiae</i> .....	260
Figura 151. S-EM-83 . <i>S. cerevisiae</i> .....	261
Figura 152. S-EM-86 . <i>S. cerevisiae</i> .....	261
Figura 153. S-EM-91 . <i>S. cerevisiae</i> .....	261
Figura 154- E-EM-93 . <i>S. cerevisiae</i> .....	261
Figura 155. S-EM-94 . <i>S. cerevisiae</i> .....	262
Figura 156. S-EM-99 . <i>S. cerevisiae</i> .....	262
Figura 157. S-EM-100 . <i>S. cerevisiae</i> .....	262
Figura 158. S-EM-240 . <i>S. cerevisiae</i> .....	262
Figura 159. S-EM-241 . <i>S. cerevisiae</i> .....	263
Figura 160. S-EM-244. <i>S. cerevisiae</i> .....	263
Figura 161. S-EM-246 . <i>S. cerevisiae</i> .....	263
Figura 162. S-EM-247 <i>S. cerevisiae</i> .....	263
Figura 163. S-EM-248 . <i>S. cerevisiae</i> .....	264
Figura 164. S-EM-250 <i>S-cerevisiae</i> .....	264

Figura 165. S-EM-251 . <i>S. cerevisiae</i> .....	264
Figura 166. S-EM-254 . <i>S. cerevisiae</i> .....	264
Figura 167. S-EM-255 . <i>S. cerevisiae</i> .....	265
Figura 168. S-EM-258 . <i>S. cerevisiae</i> .....	265
Figura 169. S-EM-259 . <i>S. cerevisiae</i> .....	265
Figura 170. S-EM-261 . <i>S. cerevisiae</i> .....	265
Figura 171. S-EM-262 <i>S. cerevisiae</i> .....	266
Figura 172. S-EM-266 . <i>S. cerevisiae</i> .....	266
Figura 173. S-EM-302 . <i>S. cerevisiae</i> .....	266
Figura 174. S-EM-304 . <i>S. cerevisiae</i> .....	266
Figura 175. S-EM-305 . <i>S. cerevisiae</i> .....	267
Figura 176. S-EM-310 . <i>S. cerevisiae</i> .....	267
Figura 177. S-EM-311 <i>S. cerevisiae</i> .....	267
Figura 178. S-EM-313 . <i>S. cerevisiae</i> .....	267
Figura 179. S-EM-314 . <i>S. cerevisiae</i> .....	268
Figura 180. S-EM-316 . <i>S. cerevisiae</i> .....	268
Figura 181. S-EM-317 . <i>S. cerevisiae</i> .....	268
Figura 182. S-EM-318 . <i>S. cerevisiae</i> .....	268
Figura 183. S-EM-321 . <i>S. cerevisiae</i> .....	269
Figura 184. S-EM-322 . <i>S. cerevisiae</i> .....	269
Figura 185. S-EM-181 . <i>S. cerevisiae</i> .....	269
Figura 186. S-EM-182 . <i>S. cerevisiae</i> .....	269
Figura 187. S-EM-184 . <i>S. cerevisiae</i> .....	270
Figura 188. S-EM-341 . <i>S. cerevisiae</i> .....	270
Figura 189. S-EM-342 . <i>S. cerevisiae</i> .....	270
Figura 190. S-EM-344 . <i>S. cerevisiae</i> .....	270
Figura 191. S-EM-345 . <i>S. cerevisiae</i> .....	271
Figura 192. S-EM-349 . <i>S. cerevisiae</i> .....	271
Figura 193. S-EM-352 . <i>S. cerevisiae</i> .....	271
Figura 194. S-EM-356 . <i>S. cerevisiae</i> .....	271
Figura 195. S-EM-360 . <i>S. cerevisiae</i> .....	272
Figura 196. S-EM-361 . <i>S. cerevisiae</i> .....	272
Figura 197. S-EM-364 . <i>S. cerevisiae</i> .....	272
Figura 198. S-EM-367 . <i>S. cerevisiae</i> .....	272
Figura 199. S-EM-368 . <i>S. cerevisiae</i> .....	273
Figura 200. S-O-21 . <i>S. cerevisiae</i> .....	273

Figura 201. S-O-24 . <i>S. cerevisiae</i> .....	273
Figura 202. S-O-26 . <i>S. cerevisiae</i> .....	273
Figura 203. S-O-29 . <i>S. cerevisiae</i> .....	274
Figura 204. S-O-38 . <i>S. cerevisiae</i> .....	274
Figura 205. S-O-40 . <i>S. cerevisiae</i> .....	274
Figura 206. S-O-47 <i>S. cerevisiae</i> .....	274
Figura 207. S-O-56 . <i>S. cerevisiae</i> .....	275
Figura 208. S-O-58 . <i>S. cerevisiae</i> .....	275
Figura 209. S-O-64 . <i>S. cerevisiae</i> .....	275
Figura 210. S-O-14 . <i>S. cerevisiae</i> .....	275
Figura 211. S-O-16 . <i>S. cerevisiae</i> .....	276
Figura 212. S-O-302 . <i>S. cerevisiae</i> .....	276
Figura 213. S-O-319 . <i>S. cerevisiae</i> .....	276
Figura 214. S-O-320 . <i>S. cerevisiae</i> .....	276
Figura 215. S-O-323 . <i>S. cerevisiae</i> .....	277
Figura 216. S-O-326 . <i>S. cerevisiae</i> .....	277
Figura 217. S-O-331 . <i>S. cerevisiae</i> .....	277
Figura 218. S-O-335 <i>S. cerevisiae</i> .....	277
Figura 219. S-O-275 . <i>S. cerevisiae</i> .....	278
Figura 220. S-O-285 <i>S. cerevisiae</i> .....	278
Figura 221. S-O-286 . <i>S. cerevisiae</i> .....	278
Figura 222. S-O-289. <i>S.cerevisiae</i> . ....	278
Figura 223. S-O-290 . <i>S. cerevisiae</i> .....	279
Figura 224. NS-O-70. <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	283
Figura 225. NS-O-73. <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	283
Figura 226. NS-O-82. <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	283
Figura 227. NS-O-105. <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	284
Figura 228. NS-PDC-121 <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	284
Figura 229. NS-PDC-125 <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	284
Figura 230. NS-PDC-129 <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	284
Figura 231. NS-PDC-134 <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	285
Figura 232. NS-PDC-135 <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	285
Figura 233. NS-PDC-261 <i>Cryptococcus amylo lentus</i> .....	285
Figura 234. NS-PDC-262 <i>Cryptococcus amylo lentus</i> .....	285
Figura 235. NS-PDC-243 <i>Cryptococcus amylo lentus</i> .....	286
Figura 236. NS.PDC.248 <i>Cryptococcus amylo lentus</i> .....	286

Figura 237. NS-PDC-249 <i>Cryptococcus amylolentus</i> .....	286
Figura 238. NS-PDC-254 <i>Cryptococcus amylolentus</i> .....	286
Figura 239. NS-PDC-257 <i>Cryptococcus amylolentus</i> .....	287
Figura 240. NS-PDC-132 <i>Cryptococcus amylolentus</i> .....	287
Figura 241. NS-G-15 <i>Hanseniaspora opuntiae</i> .....	287
Figura 242. NS-G-16 <i>Hanseniaspora opuntiae</i> .....	288
Figura 243. NS-G-20 <i>Hanseniaspora opuntiae</i> .....	288
Figura 244. NS-G-23 <i>Hanseniaspora opuntiae</i> .....	288
Figura 245. NS-G-4 <i>Hanseniaspora opuntiae</i> .....	288
Figura 246. NS-G-5 <i>Hanseniaspora opuntiae</i> .....	289
Figura 247. NS-G-7 <i>Hanseniaspora opuntiae</i> .....	289
Figura 248. NS-G-8 <i>Hanseniaspora opuntiae</i> .....	289
Figura 249. NS-G-33 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	289
Figura 250. NS-G-35 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	290
Figura 251. NS-G-39 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	290
Figura 252. NS-G-40 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	290
Figura 253. NS-G-43 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	290
Figura 254. NS-G-47 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	291
Figura 255. NS-G-49 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	291
Figura 256. NS-G-51 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	291
Figura 257. NS-G-53 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	291
Figura 258. NS-G-56 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	292
Figura 259. NS-EM-CV-1. <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	292
Figura 260. NS-EM-CV-25 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	292
Figura 261. NS-EM-VR-101 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	292
Figura 262. NS-EM-VR-125 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	293
Figura 263. NS-O-1. <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	293
Figura 264. NS-O-23 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	293
Figura 265. NS-O-120*. <i>M. viticola</i> * .....	293
Figura 266. NS-O-57 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	294
Figura 267. NS-O-157 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	294
Figura 268. NS-PDC-1 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	294
Figura 269. NS-PDC-10 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	294
Figura 270. NS-PDC-13 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	295
Figura 271. NS-PDC-105 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	295
Figura 272. NS-PDC-100 <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	295

Figura 273. NS-PDC-99 <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	295
Figura 274. NS-EM-HO-136 <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	296
Figura 275. NS-EM-MA-67 <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	296
Figura 276. NS-EM-VR-119 <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	296
Figura 277. NS-G-13 <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	296
Figura 278. NS-G-3 <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	297
Figura 279. NS-G-32 <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	297
Figura 280. NS-O-46 <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	297
Figura 281. NS-PDC-75 <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	297
Figura 282. NS-PDC-41 <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	298
Figura 283. NS-PDC-44 <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	298
Figura 284. NS-EM-VR-113 <i>Metschnikowia fructicola</i> .....	298
Figura 285. NS-O-61 <i>Metschnikowia fructicola</i> .....	298
Figura 286. NS-O-69 <i>Metschnikowia fructicola</i> .....	299
Figura 287. NS- O-29 <i>Metschnikowia fructicola</i> .....	299
Figura 288. NS-PDC-14 <i>Metschnikowia fructicola</i> .....	299
Figura 289. NS-PDC-191 <i>Metschnikowia fructicola</i> .....	299
Figura 290. NS-PDC-193 <i>Metschnikowia fructicola</i> .....	300
Figura 291. NS-PDC-194 <i>Metschnikowia fructicola</i> .....	300
Figura 292. NS-PDC-195 <i>Metschnikowia fructicola</i> .....	300
Figura 293. NS-PDC-207 <i>Metschnikowia fructicola</i> .....	300
Figura 294. NS-EM-VR-111 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	301
Figura 295. NS-O-88 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	301
Figura 296. NS-O-221 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	301
Figura 297. NS-O-223 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	301
Figura 298. NS-O-235 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	302
Figura 299. NS-PDC-141 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	302
Figura 300 NS-PDC-143 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	302
Figura 301 NS-PDC-147 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	302
Figura 302. NS-PDC-149 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	303
Figura 303. NS.PDC.150 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	303
Figura 304. NS-O-32 <i>Metschnikowia viticola</i> .....	303
Figura 305. NS-O-35 <i>Metschnikowia viticola</i> .....	303
Figura 306. NS-O-100 <i>Metschnikowia viticola</i> .....	304
Figura 307. NS-O-110 <i>Metschnikowia viticola</i> .....	304
Figura 308. NS-O-111 <i>Metschnikowia viticola</i> .....	304



Figura 309. NS-O-118 <i>Metschnikowia viticola</i> .....	304
Figura 310. NS-O-97 <i>Metschnikowia viticola</i> .....	305
Figura 311. NS- O-45 <i>Metschnikowia viticola</i> .....	305
Figura 312. NS-G-57 <i>Meyerozyma guilliermondii</i> .....	305
Figura 313. NS-G-61 <i>Rhodosporidium toruloides</i> .....	306
Figura 314. NS-G-70 <i>Rhodosporidium toruloides</i> .....	306
Figura 315. NS-G-24 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	306
Figura 316. NS-G-30 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	307
Figura 317. NS-G-31 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	307
Figura 318. NS-G-37 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	307
Figura 319. NS-G-42 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	307
Figura 320. NS-G-44 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	308
Figura 321. NS-G-48 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	308
Figura 322. NS-G-50 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	308
Figura 323. NS-G-52 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	308
Figura 324. NS-G-54 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	309
Figura 325. NS-G-55 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	309
Figura 326. NS-G-27 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	309
Figura 327. NS-G-46 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	309
Figura 328. NS-G-62 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	310
Figura 329. NS-G-66 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	310
Figura 330. NS-G-71 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	310
Figura 331. NS-G-72 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	310
Figura 332. NS-G-9 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	311
Figura 333. NS-PDC-169 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	311
Figura 334. NS-G-34 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....	311
Figura 335. NS-O-11 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....	311
Figura 336. NS-O-14 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....	312
Figura 337. NS-PDC-167 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....	312
Figura 338. NS-PDC-171 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....	312
Figura 339. NS-G-58 <i>Zygopsaccharomyces bailli</i> .....	312
Figura 340. NS-G-63 <i>Zygopsaccharomyces bailli</i> .....	313
Figura 341. <i>M. fructicola</i> tipo CBS8853.....	317
Figura 342. NS-EM-113. <i>M. fructicola</i> .....	317
Figura 343. NS-O-29. <i>M. fructicola</i> .....	317
Figura 344. NS-O-61. <i>M. fructicola</i> .....	317

Figura 345. NS-O-69. <i>M. fructicola</i> .....	317
Figura 346. NS-O-23. <i>H. uvarum</i> .....	317
Figura 347. NS-PDC-191. <i>M. fructicola</i> .....	318
Figura 348. NS-PDC-193. <i>M. fructicola</i> .....	318
Figura 349. NS-PDC-194. <i>M. fructicola</i> .....	318
Figura 350. NS-PDC-195. <i>M. fructicola</i> .....	318
Figura 351. NS-PDC-207. <i>M. fructicola</i> .....	318
Figura 352. <i>M. pullcherrima</i> tipo CECT11202.....	318
Figura 353. NS-EM-111. <i>M. pullcherrima</i> .....	319
Figura 354. NS-O-221. <i>M. pullcherrima</i> .....	319
Figura 355. NS-O-223. <i>M. pullcherrima</i> .....	319
Figura 356. NS-O-235. <i>M. pullcherrima</i> .....	319
Figura 357. NS-O-88. <i>M. pullcherrima</i> .....	319
Figura 358. NS-PDC-141. <i>M. pullcherrima</i> .....	319
Figura 359. NS-PDC-143. <i>M. pullcherrima</i> .....	320
Figura 360. NS-PDC-147. <i>M. pullcherrima</i> .....	320
Figura 361. NS-PDC-149. <i>M. pullcherrima</i> .....	320
Figura 362. NS-PDC-150. <i>M. pullcherrima</i> .....	320
Figura 363. NS-O-70. <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	323
Figura 364. NS-PDC-261 <i>Cryptococcus amylo lentus</i> .....	323
Figura 365. NS-G-33 <i>Hanseniaspora osmophila</i> .....	323
Figura 366. NS-G-15 <i>Hanseniaspora opuntiae</i> .....	323
Figura 367. NS-EM-CV-1 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	323
Figura 368. NS-PDC-100 <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	323
Figura 369. NS-G-13 <i>Lanchancea thermotolerans</i> .....	324
Figura 370. NS-O-32 <i>Metschnikowia viticola</i> .....	324
Figura 371. NS-G-57 <i>Meyerozyma guilliermondii</i> .....	324
Figura 372. NS-G-61 <i>Rhodospordium toruloides</i> .....	324
Figura 373. NS-G-24 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	324
Figura 374. NS-G-27 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	324
Figura 375. NS-G-34 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....	325
Figura 376. NS-G-58 <i>Zygosaccharomyces bailii</i> .....	325
Figura 377. Espectro de masas cepa NS-EM-119 nuevo crecimiento.....	329
Figura 378. Espectro de masas cepa NS-EM-119 muestra congelada 1 .....	329
Figura 379. Espectro de masas cepa NS-EM-119 muestra congelada 2 .....	329

Figura 380. Espectro de masas de librería cepa NS-O-46, 1ª identificación en análisis de NS-EM-119 nuevo crecimiento.....	329
Figura 381. .Espectro de masas de librería cepa NS-EM-119.....	330
Figura 382. Espectro de masas cepa NS-O-11 nuevo crecimiento .....	330
Figura 383. Espectro de masas cepa NS-O-11 muestra congelada 1 .....	330
Figura 384. Espectro de masas cepa NS-O-11 muestra congelada 2 .....	330
Figura 385. Espectro de masas de librería cepa NS-O-14, 1ª identificación en análisis de NS-O-11 nuevo crecimiento.....	331
Figura 386. Espectro de masas de librería cepa NS-O-11.....	331
Figura 387. Espectro de masas cepa NS-O-46 nuevo crecimiento .....	331
Figura 388. Espectro de masas cepa NS-O-46 muestra congelada 1 .....	331
Figura 389. Espectro de masas cepa NS-O-46 muestra congelada 2 .....	332
Figura 390. Espectro de masas de librería cepa NS-EM-119, 1ª identificación en análisis de NS-O-46 muestra congelada 1 y 2 .....	332
Figura 391. . Espectro de masas de librería cepa NS-O-46.....	332
Figura 392. Espectro de masas cepa NS-PDC-99 nuevo crecimiento .....	332
Figura 393. Espectro de masas cepa NS-PDC-99 muestra congelada 1 .....	333
Figura 394. Espectro de masas cepa NS-PDC-99 muestra congelada 2 .....	333
Figura 395. Espectro de masas de librería cepa NS-PDC-99.....	333
Figura 396. Espectro de masas cepa NS-PDC-262 nuevo crecimiento .....	333
Figura 397. Espectro de masas cepa NS-PDC-262 muestra congelada 1 .....	334
Figura 398. Espectro de masas cepa NS-PDC-262 muestra congelada 2 .....	334
Figura 399. Espectro de masas de librería cepa NS-PDC-248, 1ª identificación en análisis de NS-PDC-262 nuevo crecimiento.....	334
Figura 400. Espectro de masas de librería cepa NS-PDC-262.....	334



## RESUMEN & SUMMARY

---



## RESUMEN

Esencialmente, la tesis presentada bajo el título “Taxonomía de levaduras de origen enológico por espectrometría de masas” trata sobre la implementación del proceso de identificación y clasificación taxonómica de levaduras de interés enológico mediante el empleo de la técnica MALDI-TOF MS, como alternativa a la utilización de técnicas clásicas y moleculares.

Se ha creado una librería de espectros de masas mediante MALDI-TOF MS con una extensa colección de levaduras aisladas del entorno enológico. Debido a la importancia en enología de las propiedades a nivel de cepa de las levaduras, el estudio se ha realizado a distintos niveles de complejidad taxonómica, abordando la diferenciación de levaduras por esta técnica a los niveles de género, especie y cepa. Se ha realizado la diferenciación a nivel de especie de aislamientos seleccionados correspondientes a diferentes especies de levaduras no-*Saccharomyces*. Finalmente, como problemas más complejos a resolver, se ha estudiado la diferenciación de dos especies íntimamente relacionadas y muy difíciles de distinguir por técnicas clásicas y moleculares (*Metschnikowia pulcherrima* y *Metschnikowia fructicola*) y se ha conseguido, empleando la técnica MALDI-TOF MS, la diferenciación a nivel de cepa de un elevado número de aislamientos de *Saccharomyces cerevisiae*, responsable principal de la fermentación alcohólica en la producción de vino.

Las levaduras en estudio se han aislado durante las vendimias de los años 2011 a 2014 en las bodegas Emilio Moro, Pago de Carraovejas, Ossian y Gordonzello, pertenecientes a tres Denominaciones de Origen: Ribera de Duero, Rueda y Tierra de León. En total se han realizado 1665 aislamientos correspondientes a dos grandes grupos, *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, de los cuales se han seleccionado 216 para el análisis por espectrometría de masas, 98 cepas de *S. cerevisiae* y 118 cepas pertenecientes a especies no-*Saccharomyces*. Las levaduras seleccionadas han sido identificadas previamente por técnicas clásicas y moleculares basadas en el ADN. En el caso de *S. cerevisiae* se ha realizado la diferenciación a nivel de cepa mediante la amplificación por PCR de los polimorfismos de la región interdelta,

y para las especies de no-*Saccharomyces* se ha empleado la secuenciación de una región del ADNr 26S.

Debido a que la aplicación de la técnica MALDI-TOF MS para el análisis de microorganismos está principalmente desarrollada en el ámbito clínico con fines de diagnóstico de enfermedades, actualmente el contenido de las librerías comerciales de microorganismos es principalmente de microorganismos patógenos y su identificación y diferenciación es a nivel de especie; por otra parte, el número de espectros de masas de microorganismos pertenecientes al campo enológico incluidos en estas librerías es muy limitado, por lo que se ha creado una librería de espectros de masas de levaduras procedentes de este ámbito.

El equipo empleado para el análisis ha sido un espectrómetro de masas MALDI-TOF, modelo Ultraflex II LIFT de Bruker. La optimización del proceso de preparación de muestra consistió esencialmente en la preparación de los extractos de proteínas de las levaduras. Se han optimizado los parámetros más importantes, incluyendo cultivo de las levaduras, tipo de placa MALDI, tipo de matriz, así como otros parámetros implicados en la técnica para obtener espectros de masas de forma sencilla y reproducible.

Para la creación de la librería de espectros de masas sintéticos, cada espectro de masas ha sido procesado con un programa estadístico programado en R mediante el empleo de un paquete desarrollado para la identificación de los iones representativos de cada espectro de masas en forma de líneas, las cuales se detectan en un margen de relación señal/ruido (SNR) de 20 a 5. El procedimiento aplicado en la selección de los iones representativos ha consistido en disminuir progresivamente la SNR hasta detectar un mínimo de 20 líneas o hasta que la SNR descendía hasta un valor de 5.

Cada uno de los espectros de masas sintéticos correspondientes a cada cepa de levadura se ha generado a través de un programa desarrollado en lenguaje FORTRAN, a partir del análisis por triplicado de cada cepa de levadura.



La librería ha sido validada realizando la identificación de cepas de levadura tanto de *S. cerevisiae* como de especies pertenecientes a géneros no-*Saccharomyces*, comprobándose que permite la identificación a nivel de especie. La librería generada contiene 216 espectros de masas sintéticos de cepas de levadura de interés enológico. Esta librería ha permitido la comparación, diferenciación e identificación de diferentes especies de levaduras asignando porcentajes de similitud entre las diferentes cepas de levadura estudiadas.

La diferenciación e identificación de las especies *M. fructicola* y *M. pulcherrima* (que no estaban claramente diferenciadas mediante técnicas biológicas clásicas y moleculares) ha sido posible mediante análisis de varias cepas de cada especie empleando MALDI-TOF MS, y comparando con cepas Tipo procedentes de colecciones internacionales de cultivos; la diferenciación de estas dos especies es patente por cuanto que *M. fructicola* presenta dos iones entorno a 6.800 m/z (aproximadamente a una relación m/z de 6.815 y 6.865) mientras que *M. pulcherrima* presenta un solo ión (aproximadamente a una relación m/z de 6.865) en esta zona. Igualmente, la especie *M. pulcherrima* presenta un ión entorno a la relación m/z 3.400 (aproximadamente a una relación m/z de 3.430) mientras que la especie *M. fructicola* presenta dos iones (aproximadamente a una relación m/z de 3.405 y 3.430).

Cabe resaltar que al comparar los espectros de masas de cada una de las cepas analizadas con los espectros de masas de las cepas tipo de *M. fructicola* y *M. pulcherrima*, se ha comprobado que la identificación asignada para cada especie mediante técnicas clásicas y moleculares no se corresponde con la identificación mediante MALDI-TOF MS, ofreciendo una asignación cruzada. A diferencia de las técnicas clásicas y moleculares, la técnica MALDI-TOF MS permite la diferenciación rápida y precisa, en concreto, de estas dos especies, evitando las identificaciones erróneas asignadas por la técnica de secuenciación del ADNr 26S.



## SUMMARY

The PhD work entitled “Taxonomy of the origin of oenological yeasts by mass spectrometry” presents an approach to implementing the MALDI-TOF MS technique for the identification and taxonomic classification of oenological yeasts, which proves to be a more reliable alternative to classical and molecular techniques.

A MALDI-TOF mass spectra library has been created containing an extensive collection of yeasts which have been isolated from oenological environments. Due to the importance of properties at the yeast strain level, the study was carried out at different levels of taxonomic complexity, addressing the differentiation of yeasts at the level of genus, species and strain. At species level, the differentiation of selected isolates corresponding to non-*Saccharomyces* yeasts has been attempted. Furthermore, the complex differentiation of two closely related species (*Metschnikowia pulcherrima* and *Metschnikowia fructicola*), which proves especially difficult to achieve using classical and molecular techniques, has been carried out. At strain level, the MALDI-TOF MS technique has been applied to differentiate a great number of *S. cerevisiae* yeast isolates, which are mainly responsible for alcoholic fermentation during wine production.

The studied yeasts were isolated during the grape harvest of the years 2011 to 2014 in the Emilio Moro, Pago Carraovejas, Ossian and Gordonzello wineries, belonging to three designations of origin, Ribera de Duero, Rueda and Tierra de León. In total, 1665 yeast isolates belonging to two big groups have been studied, *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*. 216 of them have been selected for analysis by mass spectrometry; 98 are *S. cerevisiae* strains and 118 are non-*Saccharomyces* species. The selected yeasts have been previously identified by classical and molecular techniques based on DNA. In the case of *S. cerevisiae*, the differentiation at strain level was based on PCR amplification of polymorphisms in the interdelta region, while sequencing of the 26S rDNA region was used for non-*Saccharomyces* species.

Due to the fact that the application of MALDI-TOF MS to the analysis of microorganisms is mainly developed in the clinical field for the diagnosis of diseases, nowadays commercial libraries generally contain pathogenic microorganisms and their identification and differentiation is at species level. Consequently, a mass spectra library containing yeasts from the oenological field has been created.

Yeast strain samples have been analysed by using the MALDI-TOF mass spectrometer Ultraflex II LIFT model from Bruker Company. Optimization of sample preparation consisted essentially of protein extraction from yeasts. Among the important parameters optimized were yeast growth, MALDI plate type and its preparation, matrix type, and other parameters required by the technique in order to obtain mass spectra in a simple and reproducible way.

With the aim of creating a synthetic mass spectra library, each mass spectrum was processed by means of the statistical software in R programming language using a package developed to identify each representative ion of the mass spectrum as a line, which was detected in a range of signal/noise ratios from 20 to 5. The procedures applied to select the representative ions were to gradually decrease the signal/noise ratio to detect a minimum of 20 lines, or to decrease the signal/noise ratio to a value of 5.

Each of the synthetic mass spectra, from the analysis in triplicate of every yeast strain, was generated by using a program developed in FORTRAN programming language.

The library has been validated by performing the identification of both *S. cerevisiae* strains and species belonging to several non-*Saccharomyces* genera; it has been shown that it allows their identification at species level. The created library contains 216 synthetic mass spectra of yeast strains of oenological interest. This library has allowed the comparison, differentiation and identification of different yeast species, assigning similarity percentages among the different yeast strains studied.

The differentiation and identification of the *M. pulcherrima* and *M. fructicola* species (which was not clearly achieved by means of classical biological and molecular techniques)

has been possible by means of analyzing several strains of each of the species using MALDI-TOF MS and comparing them with type strains belonging to international culture collections; the differentiation of these two species on the mass spectrum was evident since *M. fructicola* showed two ions close to a 6.800 m/z ratio (approximately at m/z ratios of 6.815 and 6.865 respectively) whereas *M. pulcherrima* presented a unique ion at approximately a m/z ratio of 6.865. Similarly, the *M. pulcherrima* species showed an ion at approximately a 3.430 m/z ratio whereas the *M. fructicola* species presented two ions at approximately 3.405 and 3.430 m/z ratios respectively.

It should be emphasized that when comparing the mass spectra of each of the strains tested with the mass spectra of the *M. fructicola* and *M. pulcherrima* type strains it was verified that the identification assigned for every species by classical and molecular technologies did not correspond with the identification by MALDI-TOF MS, offering a crossed assignment. Unlike classical and molecular techniques, MALDI-TOF MS allows the rapid and precise differentiation of these two species in particular, avoiding the erroneous assignment made by the rDNA 26S sequence technique.



# Capítulo 1

---

## INTRODUCCIÓN





## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Estudio de la diversidad de levaduras a lo largo de la historia

Desde la primera hasta la edición actual del libro *The yeasts, a taxonomic study*, el número de especies de levaduras que se han descrito ha pasado de 164 en 1.952, a 349 en 1.970, a 500 en 1.984, a 700 en 1.998 y a 1.500 en 2.011 (Kreger-Van Rij, 1984)(Lodder, 1970) (Kurtzman, 1998) (Kurtzman, 2011). El aumento en el número de levaduras existente durante este periodo se vio influenciado por varios factores de diversa índole, pero sobre todo metodológicos y a la aplicación del concepto de especie. En la primera edición (Lodder J, 1952), las especies se describieron sobre la base de la morfología y un pequeño número de ensayos fisiológicos de crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. La duplicación del número de especies que se encontró en la segunda edición se debió en parte a la incorporación de un mayor número de características nutricionales. Más adelante, la aplicación temprana de los enfoques moleculares tuvo un impacto considerable en la tercera edición, pero no fue del todo responsable de la proliferación del número de especies, ya que el cambio hacia una base genómica para la delimitación de especies también causó la fusión de variantes fisiológicos o morfológicos en especies más grandes y más diversas. La publicación de la cuarta edición coincidió con la aplicación anticipada de la secuenciación del ADN a la identificación de levaduras y la reconstrucción filogenética, aunque el impacto total que tuvo este enfoque vino después. Una vez más, el resultado fue una mezcla de fusiones de especies y subdivisiones.

El análisis de secuencias de ADN dio lugar a un enorme aumento en la facilidad y velocidad de identificación, haciendo los estudios de biodiversidad mucho más abordables. Muchas descripciones de especies actualmente publicadas proceden de material biológico recolectado en el pasado y que se almacenaron en colecciones con la esperanza de que las nuevas tecnologías pudieran eventualmente facilitar la tarea de asignar especies. El enfoque de secuenciación ha cumplido con esta necesidad. Por desgracia, las aclaraciones aportadas por los datos de secuenciación han ayudado poco para mejorar la comprensión de la historia natural o la ecología de las especies de levaduras que se describen (Cletus P., 2005).

## **1.2. Sistemática y filogenia de las levaduras. Métodos clásicos y moleculares de identificación de levaduras a nivel de género y especie**

Un factor importante que determina la validez de los estudios en ecología es la correcta identificación de las especies de levaduras en los ecosistemas, no siendo una excepción el entorno enológico, un entorno influenciado tanto por el entorno natural como por las prácticas agrícolas. Antes de la era actual de la taxonomía de levaduras, que utiliza secuencias de genes y otros criterios moleculares, las identificaciones estaban necesariamente basadas en pruebas fenotípicas. Aunque el fenotipo se puede utilizar a veces para identificar correctamente las especies de levadura, las comparaciones moleculares han demostrado que muchas identificaciones anteriores basadas en el fenotipo han sido incorrectas. Si bien esto no significa que el trabajo previo en ecología de levaduras no sea válido, sí dice que las conclusiones extraídas de ese trabajo pueden necesitar ser reexaminadas después de una identificación más precisa de las especies. En esta introducción se discutirán los métodos moleculares que ahora se utilizan para la identificación de levaduras, su impacto en la sistemática y una descripción de algunos de los métodos moleculares rápidos que son aplicables a las grandes poblaciones de especies de levaduras frecuentemente examinadas en los estudios ecológicos.

### **1.2.1. Métodos convencionales de identificación de levaduras**

Los métodos clásicos de identificación de levaduras se basan en pruebas fenotípicas, es decir, en la determinación de las características morfológicas y fisiológicas de las levaduras a identificar y requiere la realización de unas 100 pruebas, lo cual es laborioso, complejo y lleva mucho tiempo de trabajo. Se estudian la morfología de los estados asexual y sexual, la filamentación y presencia de esporas, entre otras características. Las principales pruebas fisiológicas utilizadas en identificación de levaduras son las de fermentación/asimilación de fuentes de carbono, asimilación de fuentes de nitrógeno, requerimientos de vitaminas, resistencia a cicloheximida y a diferentes temperaturas de crecimiento. Estas pruebas no siempre son estables ni fácilmente reproducibles, debido a que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden metabolizarse por rutas comunes y en ocasiones su metabolismo es

controlado por varios genes. Las pruebas de fermentación de azúcares no son muy exactas debido a que las levaduras de fermentación lenta no liberan el CO<sub>2</sub> de forma suficiente como para que sea atrapado en una campana Durham, lo cual ha provocado que especies consideradas durante mucho tiempo no fermentativas, hayan tenido que reclasificarse (Boekhout T, 1996).

### **1.2.2. Identificación molecular de levaduras**

La transición desde la identificación fenotípica de las levaduras a la identificación molecular comenzó con la determinación del porcentaje de guanina (G) más citosina (C) del ADN nuclear. Estos análisis demostraron que las levaduras de tipo ascomiceto tienen desde aproximadamente 28% a 50% mol G+C, mientras que las levaduras de tipo basidiomiceto van desde aproximadamente el 50% al 70% mol G+C. Dependiendo de los métodos analíticos utilizados, las cepas que diferían en 1-2% en dicho porcentaje eran reconocidas como especies separadas (Price CW, 1978). Posteriormente, con la técnica de reasociación del ADN nuclear o hibridación del ADN se consiguió evaluar cuantitativamente la similitud genética entre cepas y especies. La técnica de la reasociación consiste en mezclar el ADN del par de especies de interés, se separan las dos hebras del ADN, dejándose posteriormente reasociar. El grado de relación entre las especies mezcladas se determina por una medida de reasociación. Se han descrito muchos métodos diferentes para medir este proceso, que se puede hacer espectrofotométricamente o mediante el uso de isótopos radiactivos u otros marcadores (Kurtzman, 1993). Los datos de reasociación del ADN son muy dependientes de las condiciones experimentales y los diferentes métodos empleados no dan esencialmente el mismo resultado (Bonner, 1973) (Britten, 1974) (Kurtzman, 1993). Estos estudios de reasociación de ADN nuclear han tenido un marcado impacto en el reconocimiento de especies de levaduras, pero los métodos son muy trabajosos y el resultado no va más allá de resolver ciertos problemas taxonómicos entre especies estrechamente relacionadas. Sin embargo, posteriormente la secuenciación génica ha ofrecido un método rápido para el reconocimiento de las especies y su resolución no se limita tan solo a taxones estrechamente relacionados.

### 1.2.2.1. Secuenciación de la región D1/D2 para la identificación de levaduras

Peterson y Kurtzman en 1991 determinaron que el dominio 2 del ADN ribosómico (ADNr) de la subunidad grande (26S) del ribosoma es lo suficientemente variable para resolver a nivel de especie (Figura 1) (Peterson, 1991). Kurtzman y Robnett (1998) ampliaron el trabajo anterior mediante la secuenciación de ambos dominios 1 y 2 (aproximadamente 600 nucleótidos) del ADNr para todas las levaduras de tipo ascomiceto conocidas, proporcionando así una base de datos universalmente disponible para la rápida identificación de especies conocidas, la detección de nuevas especies y la ubicación filogenética inicial de la especie en cuestión. Posteriormente, Fell et al. (2000) publicaron las secuencias D1/D2 de levaduras de tipo basidiomiceto, completando así la base de datos para todas las levaduras conocidas hasta el momento. Este es un método dependiente de cultivo ya que requiere la extracción del ADN desde un cultivo puro. Se basa en la amplificación de la región D1/D2 del gen ARN 26S y de la posterior secuenciación del amplicón resultante (Vallejo, 2013). La secuencia de D1/D2 difiere más de un 1% entre especies distintas y menos de un 1% entre cepas pertenecientes a la misma especie. En general, las cepas de una especie no muestran más de entre cero y tres diferencias de nucleótidos (0-0,5%), y las cepas que muestran seis o más sustituciones no contiguas de nucleótidos (1%) son especies separadas. Las cepas con un número de sustituciones de nucleótidos intermedio también son propensas a ser especies separadas. La base de datos D1/D2 ha tenido un gran impacto al permitir la detección de un gran número de nuevas especies, lo que dio lugar a casi la duplicación de las especies conocidas desde la publicación de la cuarta edición de *The yeasts, a taxonomic study* (Kurtzman y Fell, 1998). Otro uso directo de esta base de datos es el que una persona que no sea especialista en taxonomía de levaduras puede ahora rápidamente y con precisión identificar las especies más conocidas, así como reconocer nuevas especies, todo ello tan solo mediante la secuenciación de aproximadamente 600 nucleótidos de la región D1/D2 y haciendo una búsqueda BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> en el GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, 2015).

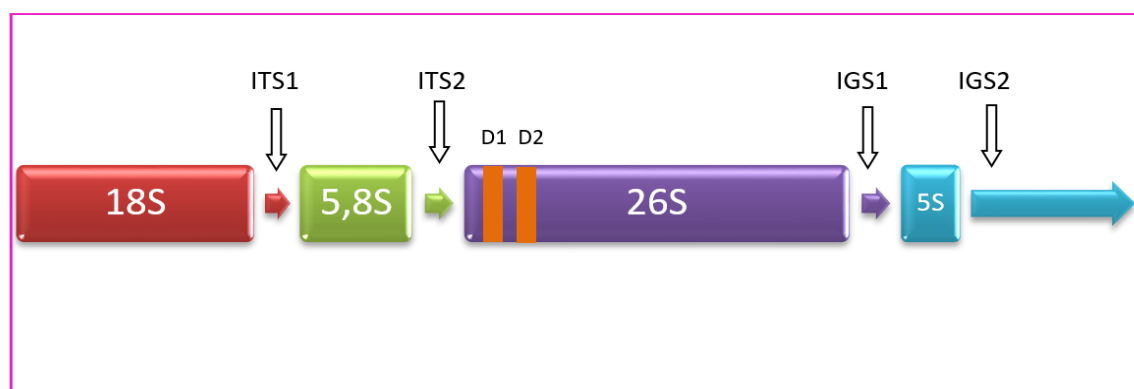


Figura 1. Esquema de las regiones del ADNr mostrando las regiones 18S, 5.8S y 26S del ARNr y la región ITS con algunos cebadores usados en las reacciones de PCR usadas para su amplificación. Estas regiones poseen un elevado interés en la taxonomía de levaduras.

La producción de ribosomas, que contienen un total de 77 proteínas diferentes además de los cuatro RNA ribosomales (ARNr), ocurre en la levadura a velocidades realmente vertiginosas: se calcula que una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza unos cuatro ribosomas por segundo. Parte de esta velocidad se debe a la disposición de los genes que codifican por los RNA ribosomales al genoma: los cuatro genes se encuentran contenidos en el genoma, creando un paquete de unas 9 kilobases, y esta subunidad básica se encuentra repetida entre 50 y 200 veces. Mientras que las secuencias que codifican por los diferentes ARNr se encuentran extraordinariamente conservadas entre especies e incluso entre géneros, familias y órdenes diferentes, las zonas de DNA entre estas secuencias codificantes, denominadas ITS (*Internal Transcribed Spacers*, secuencias internas transcritas) son zonas muy poco conservadas. Las regiones ITS (ITS1 e ITS2), que están separadas entre sí por el gen 5.8S de ADNr, presentan una alta sustitución de bases y, a menudo, se utilizan para la identificación de especies y géneros de levaduras, pero para muchas especies, las secuencias de ITS no dan una mayor resolución que la obtenida a partir de los dominios D1/D2 del 26S (James, S.A., 1996) (Kurtzman y Robnett, 2003). Sin embargo, Fell y Blatt (1999) fueron capaces de resolver el complejo de especies *Xanthophyllomyces dendrorhous* que no había sido posible resolver con el análisis de la secuencia de los dominios D1/D2, y Scorzetti et al. En 2002 publicaron sus secuencias para proporcionar una mayor resolución entre muchas especies basidiomicetas de lo que se ha encontrado para D1/D2, aunque, algunas especies fueron peor identificadas usando ITS que usando D1/D2 (Scorzetti, 2002).

En consecuencia, cuando se comparan especies estrechamente relacionadas, parece útil secuenciar ambas regiones, D1/D2 e ITS.

Hasta este momento el foco de nuestra discusión sobre la identificación de especies a partir de secuencias de genes ha estado en el ADNr. Una ventaja importante del ADNr es que está presente en todos los organismos vivos, tiene un origen evolutivo común, es multicopia y es fácil de secuenciar porque los pares de cebadores diseñados para las regiones conservadas, en general, se pueden utilizar para todos los organismos. Sin embargo, las secuencias de otros genes distintos a los del ADNr se han utilizado para la clasificación de especies de muchos tipos de hongos (Geiser DM, 1998) (O'Donnell K, 2000), incluyendo las levaduras. Belloch et al. (2000) demostraron la utilidad de la citocromo oxidasa II para la resolución de especies del género *Kluyveromyces*; Daniel et al. (2001) han utilizado con éxito el gen de la actina-1 para las especies de *Candida*, y Kurtzman y Robnett (2003) mostraron la utilidad de la secuenciación del factor de elongación 1- $\alpha$  y la ARN polimerasa II para la resolución de las especies del género *Saccharomyces*. En la actualidad, el principal impedimento para el uso generalizado de secuencias de genes distintos de ADNr está en el desarrollo de cebadores para secuenciación que sean eficaces para todas las especies, y la construcción de bases de datos que incluyan secuencias de todas las especies conocidas de la misma forma que existen para la región D1/D2 del ADNr.

Otros métodos comúnmente utilizados basados en características moleculares, para la identificación de especies, incluyen pares de cebadores especie-específicos y sondas, la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, *randomly amplified polymorphic DNA*), los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP, *amplified fragment length polymorphisms*), los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP,  $\mu$ m) y los cariotipos. Los *Microsatellite-primed RAPDs* (Gadanhó M, 2003) y *AFLP fingerprints* (De Barros Lopes, 1999) se han utilizado con eficacia en algunos laboratorios. Una preocupación en el uso de estas dos últimas técnicas es la reproducibilidad entre laboratorios porque las pequeñas diferencias en las condiciones de PCR pueden afectar los patrones de especie-específicas que sirven como referencia. Los cariotipos realizados con electroforesis de campo pulsado y RAPD del ADN mitocondrial pueden servir en la

caracterización inicial y la identificación de especies de levaduras. Sin embargo, la interpretación de los patrones de bandas de cromosomas y los fragmentos de restricción mitocondriales para propósitos taxonómicos se complica por el alto grado de polimorfismo, tales como reordenamientos cromosómicos, dentro de algunos taxones de levadura (Spirek M, 2003).

#### **1.2.2.2. Identificación de levaduras mediante la técnica del RFLP**

EL RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) consiste en la diferenciación de las levaduras por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma, cuando esté cortado por enzimas de restricción. Metodológicamente, esta técnica consiste en amplificar el ADN de regiones como las ITS mediante PCR a partir del ADN purificado de la levadura usando oligonucleótidos cebadores especialmente diseñados, como se muestra en la Figura 2(B). Se puede utilizar tanto para distinguir entre levaduras de diferentes géneros o de diferentes especies utilizando el poder de resolución que aportan la variable longitud de los amplicones generados por la PCR como la variable cantidad y tamaño de los subfragmentos que resultan de la digestión de los productos de PCR con diferentes enzimas de restricción. De esta forma, en un gel de electroforesis de agarosa aparece un patrón de bandas polimórficas correspondientes a los diferentes tamaños de los fragmentos que se generan con el corte de cada endonucleasa de restricción. Estos fragmentos polimórficos aparecen debido a que las diferentes especies, e incluso cepas, difieren en la posición de los sitios de corte para cada endonucleasa de restricción. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas, y la existencia de patrones únicos permite la identificación (Henrick-Kling, 2000). Potencialmente, se trata de un sistema muy sensible de detección de contaminantes en las fermentaciones vínicas. Aunque este método pueda parecer complicado conceptualmente, el material necesario y las técnicas de PCR están muy normalizados. El más amplio uso que se le ha dado a la técnica RFLP ha sido en estudios de identificación y filogenia de levaduras de interés industrial (Guillamón, 1998).

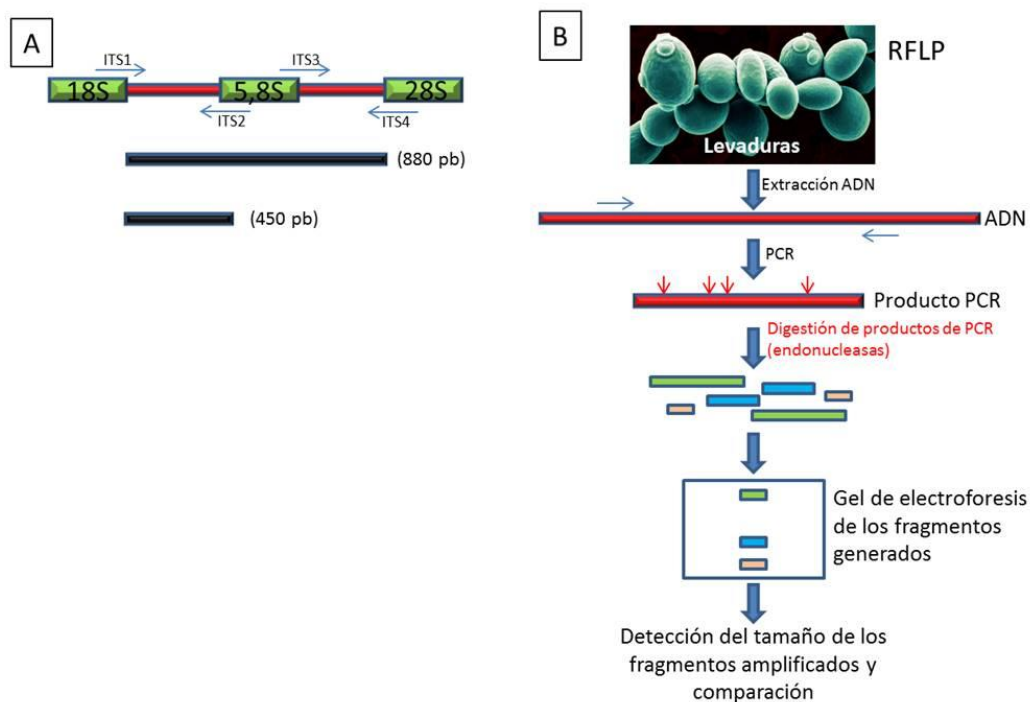


Figura 2. A. Esquema de la estructura de las subunidades repetidas de los genes de los RNAr en *S. cerevisiae*. Se indican las posiciones de dos regiones ITS y la posición relativa de los cebadores (ITS1 a 4) más utilizados en las PCR. Las regiones del ADN con secuencias conservadas se muestran en color verde, y las regiones variables, en color rojo. Las medidas de los amplicones que se obtienen comúnmente en *S. cerevisiae* se muestran en la parte inferior de la figura; varían según la especie de levadura que se ensaye. Estos amplicones muestran, además, diferentes patrones de corte para endonucleasas de restricción como CfoI, HaeIII o HinfI aplicados en la técnica RFLP.

Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), desarrollada inicialmente por la empresa de biotecnología KeyGene, son un tipo de marcador molecular que está basado en la restricción del ADN genómico mediante enzimas de restricción y en la posterior amplificación de algunos de esos fragmentos mediante PCR. Es una herramienta potente para el análisis del genoma de las levaduras dado que tiene un alto poder de detección de la variabilidad genética. El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR.

### 1.2.2.3. Identificación de levaduras mediante la técnica del AFLP

Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), desarrollada inicialmente por la empresa de biotecnología KeyGene, son un tipo de marcador molecular que está basado en la restricción del ADN genómico mediante enzimas de restricción y en la



posterior amplificación de algunos de esos fragmentos mediante PCR. Es una herramienta potente para el análisis del genoma de las levaduras dado que tiene un alto poder de detección de la variabilidad genética. El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR.

#### **1.2.2.4. Identificación de levaduras mediante la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)**

La técnica RAPD se basa en la amplificación por PCR simultánea del DNA genómico en presencia de un único cebador de pocos oligonucleótidos. Debido a la baja temperatura de hibridación (35-39 °C) el cebador se une a sitios inespecíficos, distribuidos aleatoriamente en regiones en todo el genoma, permitiendo la amplificación de fragmentos polimórficos de DNA. Los productos amplificados se visualizan por electroforesis. El uso de RAPD permite obtener diferencias de número y tamaño en los fragmentos del DNA amplificado, las cuales son específicas de especies e incluso cepas. (Ver Figura 3).

El RAPD posee potencialidades para ser empleado en estudios de control de calidad de inóculos para fabricación de bebidas, pues la comparación del cultivo original con los cultivados a gran escala, permite que cualquier contaminante microbiano sea detectado. La técnica ha sido utilizada para estudios de taxonómicos a partir del análisis del dominio D1/D2 del ADNr 26S con diferencias entre especies de hasta una única base. El RAPD-PCR se empleó recientemente en el análisis de la variabilidad genética de los miembros del grupo *Saccharomyces sensu stricto* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus*). Este estudio permitió delimitar entre estas especies estrechamente relacionadas, así como grupos intraespecíficos como los dos existentes en la especie *S. bayanus*. En el trabajo se determinó también el origen híbrido de la especie *S. pastorianus*, a partir del análisis de la fracción de bandas mostradas por cada híbrido y las cepas parentales (Fernández-Espinar, 2003).

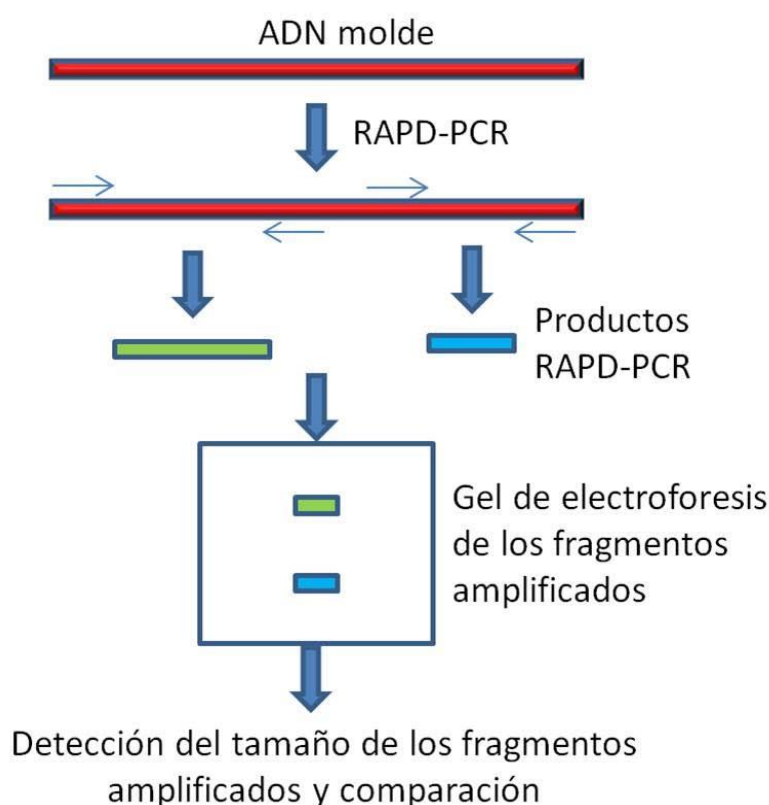


Figura 3. Diagrama esquemático de la técnica RAPD

#### 1.2.2.5. Cariotipado o separación de cromosomas.

El genoma de *S. cerevisiae* tiene un total de 14 Megabases en su dotación haploide, repartidas entre 16 cromosomas, con un tamaño que oscila entre 150 y 2000 kb. La visualización de los cromosomas de una especie, realizada por electroforesis de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), recibe el nombre de cariotipo. Las diferentes especies de levaduras presentan una gran variabilidad en número y tamaño de cromosomas, es decir, tienen cariotipos distintos. Los cariotipos de poblaciones naturales de *S. cerevisiae* del mosto son sorprendentemente variables, lo que sugiere que sólo cepas muy próximas presentan el mismo cariotipo. Sin embargo, las cepas de levadura de flor, utilizadas para elaborar el vino de jerez, presentan cariotipos muy constantes. Si nos limitamos a la levadura de la fermentación del mosto, este método permite reconocer el grado de parentesco entre cepas procedentes de diferentes instalaciones, independientemente de su morfología o de su comportamiento metabólico. De todas formas, el análisis del cariotipo por campo pulsado es caro, complicado y lento, difícil de adaptarse a un laboratorio de medias prestaciones y mucho menos de una bodega.

#### 1.2.2.6. Microsatélites

Los microsatélites son secuencias cortas compuestas de repeticiones en tándem de uno a diez nucleótidos presentes tanto en regiones codificantes como no codificantes. Son repeticiones que están distribuidas a lo largo del genoma y son altamente variables entre especies, lo que permite que sean buenos marcadores moleculares para la identificación intra e inter específica. La variabilidad de estas secuencias se detecta mediante amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos. Los perfiles que se obtienen al combinar al menos seis microsatélites permiten una diferenciación eficiente de cepas de *S. cerevisiae* (Legrás, 2005).

#### 1.2.2.7. Secuencias delta

Son secuencias de ADN de 0,3 Kb (334 pares de bases) que flanquean los retrotransposones Ty1 en *S. cerevisiae* y que están distribuidas de manera frecuente en su genoma. Se han encontrado entre 35 y 55 copias de secuencias delta en el genoma de la levadura como parte de los retrotransposones Ty1 o como elementos aislados. No obstante, estas secuencias delta se concentran en las regiones genómicas que unen los genes del ARNt. El número y la ubicación de estos elementos tienen una cierta variabilidad intraespecífica que Ness et al (1993) usaron para diseñar cebadores específicos:  $\delta 1$  y  $\delta 2$  útiles para la diferenciación de cepas *S. cerevisiae*. Se trata de la utilización de cebadores específicos a estos elementos  $\delta$  para amplificar las secuencias comprendidas entre ellos (secuencias interdelta). Legras y Karts optimizaron esta técnica diseñando dos nuevos cebadores:  $\delta 12$  y  $\delta 21$ , que están situados cerca de  $\delta 1$  y  $\delta 2$  (Legras J., 2003). El uso de estos cebadores revela polimorfismos que se ven reflejados en la aparición de un mayor número de bandas en el gel de electroforesis. Los elementos  $\delta$  solo están presentes en levaduras del género *Saccharomyces*.

### 1.3. Microbiología del vino

Tradicionalmente, la producción de vinos se ha realizado a partir de fermentaciones de los mostos, llevadas a cabo por cepas de levaduras endémicas residentes en las superficies

de las uvas y de los equipos de las bodegas (Escalante-Minakata, 2007) aunque se ha demostrado también que viven en asociación con la vid, hallándose usualmente sobre la corteza, las hojas, las flores y en la pruina de la baya. Y que su crecimiento sobre las superficies de las bayas está determinado por diversos factores ambientales, como la temperatura y la humedad, así como por el grado de madurez y el estado de salud (Leal, 2014). La fermentación con estas levaduras endémicas se llama fermentación espontánea y son de gran importancia ya que con ellas consiguen características organolépticas típicas de la zona, que no estarían presentes si se utilizara un inóculo de cepas foráneas. Sin embargo la calidad del producto puede ser muy variable (Escalante-Minakata, 2007).

### 1.3.1. Microorganismos implicados en la elaboración del vino

Actualmente la taxonomía reconoce la existencia de más de 1500 especies de levaduras, de las cuales solamente de 15 a 25 especies, englobadas en aproximadamente 17 géneros, tienen interés en enología (Carrau, 2005)(Mateos, 1997)(Pérez, 2011)(Jolly, 2006) (Álvarez Pérez, 2011).

Tanto la composición química del vino como su calidad sensorial, están directamente influenciadas por la acción secuencial de la actividad metabólica de los diferentes géneros y especies de levaduras presentes en la superficie de la uva e implicados en el proceso de elaboración de un vino. El 50-75% de la población total de levaduras aisladas corresponden a *Hanseniaspora uvarum*, el resto corresponden a la especie *Saccharomyces cerevisiae* y a otros géneros de no-*Saccharomyces*. En la tabla 1 se detallan las principales especies levaduras relacionadas con la uva y el vino, así como el hábitat o adaptaciones de cada una de ellas (Carrau, 2005) (Leal, 2014).

Tabla 1. Principales especies levaduras relacionadas con la uva y el vino (Carrau, 2005)

Género	Especies y/o Denominaciones antiguas	Denominación actual según: (Kreger-Van Rij, 1984); (Barnett, 1992); (Martini, 1993).	Hábitat o adaptaciones
<b><i>Saccharomyces</i></b>	<i>cerevisiae</i>	<i>cerevisiae</i>	Mayor resistencia a anaerobiosis y alcohol.
	<i>beticus</i>	<i>cerevisiae</i>	
	<i>capensis</i>	<i>cerevisiae</i>	
	<i>chevalieri</i>	<i>cerevisiae</i>	Capacidad para terminar la vinificación.
	<i>ellipsoideus</i>	<i>cerevisiae</i>	
	<i>oviformis</i>	<i>cerevisiae</i>	
	<i>bayanus</i>	<i>bayanus</i>	
	<i>uvarum</i>	<i>bayanus</i>	
	<i>fermentati</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
	<i>rosei</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
<b><i>Hanseniaspora</i></b>	<i>uvarum</i>	<i>uvarum</i>	Apiculada típica del hollejo de uva en la viña.
<b><i>Kloeckera</i></b>	<i>apiculata</i>	<i>apiculata</i>	Apiculada, forma anamorfa de <i>Hanseniaspora</i>
<b><i>Hansenula</i></b>	<i>anomala kluyveri</i>	<i>Pichia anomala</i>	En cáscaras de uva y aireación. Aumenta población en mostos aireados.
		<i>Pichia kluyveri</i>	
	<i>kluyveri</i>	<i>kluyveri</i>	En cáscaras de uva. Puede formar flor en vino.
<b><i>Pichia</i></b>	<i>membranifaciens</i>	<i>membranifaciens</i>	
<b><i>Cándida</i></b>	<i>guilliermondii</i>	<i>guilliermondii</i>	En mostos aireados, inicio de fermentación.
	<i>krusei</i>	<i>krusei</i>	
	<i>stellata</i>	<i>stellata</i>	
<b><i>Cryptococcus</i></b>	<i>albius</i>	<i>albius</i>	En uvas
<b><i>Debaryomyces</i></b>	<i>hansenii</i>	<i>hansenii</i>	
<b><i>Brettanomyces</i></b>	<i>anomalus</i>	<i>anomalus</i>	Típicos contaminantes de

	<i>bruxellensis</i>	<i>bruxellensis</i>	vinos en barricas y bodegas
	<i>intermedius</i>	<i>Brettanomyces</i>	
		<i>bruxellensis</i>	
	<i>anomala</i>	<i>anomala</i>	Anamorfa de <i>Brettanomyces</i> . También contaminante.
<i>Dekkera</i>	<i>bruxellensis</i>	<i>bruxellensis</i>	
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>	<i>marxianus</i>	Buena fermentadora
	<i>thermotolerans</i>	<i>thermotolerans</i>	
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrina</i>	<i>pulcherrina</i>	En uvas
<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	<i>glutinis</i>	En uvas
<i>Saccharomyces</i>	<i>ludwigii</i>	<i>ludwigii</i>	En uvas
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i>	<i>pombe</i>	Fermentan el ácido málico a alcohol. Desacidificación
	<i>japonicus</i>	<i>japonicus</i>	
<i>Torulaspora</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>delbrueckii</i>	Osmotolerantes. Ideales para vinos muy dulces
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>bailii</i>	<i>bailii</i>	Contaminantes de jugos y vinos. Resistencia a varios contaminantes.
	<i>florentinus</i>	<i>florentinus</i>	
	<i>bisporus</i>	<i>bisporus</i>	
	<i>rouxii</i>	<i>rouxii</i>	

El aroma y el sabor de un vino viene dado por los compuestos volátiles formados durante la fermentación incluyendo alcoholes, ésteres, ácidos orgánicos, fenoles, tioles, monoterpenos y norisoprenoides. Entre los compuestos volátiles derivados del metabolismo de la levadura se encuentran los ésteres, alcoholes y acetatos, que en diferentes combinaciones afectan la calidad y aroma del vino (Álvarez Pérez, 2012).

Las levaduras del mosto de la uva en el inicio de la fermentación del vino se pueden dividir a grandes rasgos en dos grupos diferenciados, las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* y las levaduras no-*Saccharomyces*. Las levaduras de *Saccharomyces* se derivan

principalmente de los equipos de bodega y en muy bajo número en la uva. Las levaduras no-*Saccharomyces*, se encuentra predominantemente en las uvas, pero también en menor número en los equipos e instalaciones de la bodega (Jolly, 2006). Por lo que en la trituración de la uva, y las condiciones ambientales específicas en el mosto, es decir, la presión osmótica alta, la presencia de SO<sub>2</sub>, la temperatura y la higiene bodega, todos juegan un papel en la determinación de las especies que pueden sobrevivir y crecer en el mosto, (Jolly, 2006).

Se ha estudiado que el uso cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* y levaduras no-*Saccharomyces* representan una forma viable hacia la mejora de la complejidad y la mejora de las características particulares y específicas de los vinos (Carrau, 2005) (Contreras, 2014) Las posibles interacciones sinérgicas entre diferentes levaduras pueden proporcionar una herramienta para la aplicación de las nuevas tecnologías de fermentación. Se ha demostrado que cuando algunas levaduras se desarrollan juntas en condiciones de fermentación, no lo hacen pasivamente, sino más bien interactúan (Ciani, 2009), consiguiendo diversos objetivos, tales como reducción de producción de ácido acético, aumento del tiol varietal, aumento de la concentración de geraniol, aumento de la acidez, reducción del contenido de ácido málico, mejora de los contenidos de glicerol y mejora generalizada del perfil del aroma del vino (Ciani, 2010)

#### **1.3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae***

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular del grupo de los ascomicetos. Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *S. cerevisiae* constituye la levadura y el microorganismo eucariota más estudiado, dada su importancia en la industria del vino, cerveza, bebidas destiladas y panadería. Una característica de esta levadura es el pequeño tamaño de su genoma, 12.068 Kb, lo que facilitó su secuenciación, conteniendo 5885 genes. Esta característica hace que *S. cerevisiae* sea un excelente candidato para estudiar por espectrometría de masas. Adicionalmente, tiene muchas otras virtudes que se han ido haciendo evidentes conforme se han desarrollado nuevos enfoques y métodos de estudio. La clasificación taxonómica de *S. cerevisiae* se describe en la Tabla 2 (Galarza, 2009).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*

CLASIFICACION TAXONÓMICA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Reino	<i>Hongo</i>
División	<i>Amastogomycota</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetidae</i>
Orden	<i>Endomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Subfamilia	<i>Saccaharomycetaidae</i>
Genero	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>Cerevisiae</i>

*S. cerevisiae* es la especie de levadura más importante en la microbiología del vino (Zuzuarregui Miro, 2005). Hallazgos arqueológicos apuntan al hecho de que *S. cerevisiae* se utilizó por primera vez en la elaboración del vino hace muchos años, aproximadamente en Mesopotamia en el 6000 a.C., y en Egipto y Fenicia alrededor de 5000 a.C. (Fenselau, 2001). Entre sus principales características, las relacionadas con la industria vitivinícola, son que puede producir EtOH, y puede metabolizar la glucosa y fructosa tanto por vía respiratoria como por vía fermentativa, pudiendo crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Martini, 1993). Adicionalmente, *S. cerevisiae* presenta la característica de ser una levadura Crabtree positiva, por lo que en condiciones aerobias, si la concentración de glucosa en el medio (como ocurre en los mostos) es alta, esta levadura no presenta una respiración aerobia sino un metabolismo fermentativo, produciendo alcohol rápidamente y desplazando por competencia a otros microorganismos en principio no deseables en la fermentación vinica.

Tiene gran capacidad de crecer en el mosto de la uva, que se caracteriza por un alto contenido de azúcares y bajo contenido de sustancias de nitrógeno. La especie produce altas cantidades de EtOH a la vez que consume el contenido de azúcares y baja el pH (Tiago Viana, 2012) que inhiben el crecimiento de cepas no- *Saccharomyces* (Cocolin, 2004). Además de poseer el carácter *killer*, que implica la secreción, por parte de ciertas cepas, de una proteína tóxica de baja masa molecular, llamada toxina *killer*, a la cual ellas son inmunes, que mata a células sensibles, las cuales pueden ser del mismo o diferentes



géneros. Este tipo de interacciones pueden determinar la evolución de las distintas poblaciones de levaduras durante la fermentación. En algunas ocasiones una cepa *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* predomina al final del proceso fermentativo, sugiriendo que la expresión de la toxina le permitió conducir parte de la vinificación. Este fenómeno *killer* pueden ser un método alternativo para el control de levaduras no deseadas, (Leal, 2014).

#### **1.3.1.2. no-*Saccharomyces***

Las levaduras no-*Saccharomyces* constituyen el 99% de la flora nativa de la uva (Jolly, 2003). Estas levaduras juegan un papel relevante en el impacto metabólico y la complejidad del aroma final del vino, tanto positiva como negativamente (Jolly, 2014) (Ciani, 2010).

Las levaduras no-*Saccharomyces* en la producción de vino se han considerado principalmente como organismos no deseados en las fermentaciones vínicas. Los metabolitos de descomposición más importantes producidos por estas levaduras son el ácido acético, acetaldehído, acetoína y acetato de etilo, junto con malos olores, tales como el vinilo y etilfenoles que están relacionados con el desarrollo de *Brettanomyces* / *Dekkera* spp (Ciani, 2009) (Godoy, 2013). La mayor parte de este tipo de levaduras, mueren durante las etapas iniciales de la fermentación debido a la toxicidad de la concentración de alcohol al aumentar debido al metabolismo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* (Jolly, 2003) (Esteve-Zarzoso, 1998). Sin embargo, algunas sobreviven durante la fermentación, y que además los metabolitos formados por algunas especies no-*Saccharomyces* pueden contribuir a la calidad del vino, por ejemplo la producción de glicerol por *Candida stellata* y la producción de éster por *Candida pulcherrima* que, en algunos vinos pueden tener una influencia positiva en la calidad del vino (Leal, 2014).

La producción de exo y endonucleasas por levaduras no-*Saccharomyces* juega un papel muy importante, como lo son las pectinasas que tiene algunas aplicaciones de clarificación, filtración y también la extracción de color del vino (Domizio, 2014).

### 1.3.2. Sucesión de especies de levadura desde la uva al vino

Durante la fermentación del vino las levaduras están expuestas a un gradiente extremadamente amplio de condiciones de estrés. Después de una breve etapa de aumento activo en la población, bajo estrés osmótico, el crecimiento se ralentiza, las células entran en fase estacionaria, y la fermentación se lleva a cabo por células que no se dividen aunque siguen metabólicamente activas. A medida que avanza la fermentación, disminuye la concentración de azúcar y la concentración de EtOH aumenta, el pH disminuye, y aumenta la temperatura, mejorando el efecto nocivo de las otras formas de estrés sobre otros microorganismos (Tiago Viana, 2012). Este conjunto de cambios en las condiciones del medio durante el proceso fermentativo en el vino, está asociado directamente a una sucesión de especies y cepas de la microbiota responsable del proceso de fermentación que provienen de la uva y la bodega.

En los primeros días de fermentación, los géneros mayoritarios son *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Candida* y en menor medida *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula* y *Metschnikowia*. Después de estos 2 ó 3 primeros días, estos géneros reducen su número, dando paso al crecimiento de la especie fermentadora por excelencia *Saccharomyces cerevisiae* considerada la principal especie responsable de la fermentación alcohólica hasta agotar los azúcares del mosto.

Paralelamente a esto, se ha demostrado que hay algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces*, como *Kloeckera apiculata* y *Candida stellata*, que también contribuyen a la fermentación, ya que sobreviven más de lo que se pensaba inicialmente, pudiendo alcanzar poblaciones máximas de  $10^6$ - $10^7$  ufc/mL. Por tanto, este crecimiento es cuantitativamente importante e influenciará en la composición organoléptica del vino, incluso estas especies tendrán un comportamiento competitivo con *Saccharomyces* a lo largo del proceso. A pesar de que la fermentación espontánea muestra una sucesión de géneros y especies de levaduras, finalmente sólo unas pocas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* controlan la mitad-final de la fermentación; y este es el resultado de una selección natural (Carrau, 2005).

Varios factores son los que determinan la evolución, composición y diversidad de la microbiota de levaduras presentes en el mosto, pudiendo destacar (Carrau, 2005):

- la localización geográfica y las condiciones climáticas.
- la variedad, madurez y edad de la viña.
- el uso de fungicidas.
- los daños físicos causados por hongos, insectos o pájaros a la uva.
- las condiciones de vinificación.

En una uva sana y madura, la población total de levaduras puede variar entre 103-105 ufc/mL. En la mayoría de las regiones vitícolas se sabe que la especie mayoritaria en la superficie de la uva es la levadura no-*Saccharomyces* apiculada *Hanseniaspora uvarum* y su forma imperfecta, *Kloeckera apiculata*, que representan aproximadamente el 50-75% de la población total. Otros géneros significativos, también no-*Saccharomyces*, son *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Hansenula* y *Rhodotorula* (Carrau, 2005).

Sin embargo, la presencia espontánea de *Saccharomyces* en el mosto puede deberse a dos motivos. Por una parte se piensa que los granos dañados de uvas, constituyen depósitos muy ricos para el desarrollo de microorganismos. Estos daños puede ser producidos por causas diversas como ser inclemencias meteorológicas (exceso de lluvias fuertes, granizo), infecciones con hongos, exceso de agua, insectos, pájaros, etc. y en ese depósito de microorganismos se encontraría a *Saccharomyces cerevisiae*. La segunda hipótesis, además de tener en cuenta la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* en las uvas, atribuye la principal procedencia de las mismas al ambiente de bodega, (superficies del equipamiento de bodega, en las bombas, tuberías, depósitos de fermentación etc.). Esta última es la considerada más exacta, dado que el primer caso, se ha comprobado que favorece a la flora no- *Saccharomyces* y precisamente se hace más improbable la presencia de *Saccharomyces* en mostos de uvas que no estén con perfecta sanidad. (Leal, 2014) Adicionalmente, también en las bodegas se han encontrado especies pertenecientes a los géneros *Pichia*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* y *Brettanomyces* (y su forma perfecta *Dekkera*), que serían propias de este ecosistema durante la conservación y la crianza en barricas, y no de la fruta.

### **1.3.3. Tipificación, identificación, y taxonomía microbiana**

Es importante definir los términos identificación, tipificación y taxonomía microbiana aplicados en el campo de la medicina, alimentación y concretamente en el campo de la enología. Es importante destacar que la identificación microbiana no debe confundirse con la tipificación microbiana.

La tipificación de microorganismos es la caracterización y registro de características discriminantes de cepas, en general, de la misma especie, con el foco en la definición de las diferencias. La tipificación microbiana se ha utilizado en la producción de alimentos y en la agricultura durante milenios. El reconocimiento y la asignación de un nombre a una cepa imparten implicaciones y supuestos asociados a ese organismo.

La identificación microbiana se basa en la caracterización de las cepas, con el foco en el reconocimiento de similitudes fenotípicas y genotípicas, lo que permite la asignación de cepas de determinada especie (Belda Aguilar, 2013)(Belda Manzanos, 2014). Los rasgos fenotípicos son las características observables que resultan de la expresión de los genes de un microorganismo, mientras que los rasgos genotípicos de un microorganismo son los codificados dentro de su material genético, el genoma. Identificaciones microbianas permiten diagnósticos clínicos, la comprensión de sus impactos en las actividades ambientales y conocimientos sobre las aplicaciones biotecnológicas (Amiri-Eliasi, 2001). La identificación es necesariamente dependiente de una taxonomía y la nomenclatura establecida estable (ver Figura 4) (Welker Martin, 2011).

La taxonomía microbiana puede ser considerada como el estudio de la organización y priorización de la diversidad microbiana basado en las relaciones naturales. Sin una taxonomía funcional, las identificaciones de los aislados no serían posibles. Las innovaciones y desarrollos en nuevas metodologías son esenciales para mejorar la sensibilidad y el nivel de resolución y de la fiabilidad de los resultados, así como las cuestiones prácticas de la velocidad y el coste de los análisis para la tipificación microbiana y la identificación.



género	especies	sub-especies	"tipo"	cepa	clon
<b>IDENTIFICACION</b>			<b>TIPADO</b>		
asignación a un género/especie			asignación a un (grupo de) clon (es)		
 propiedades comunes			 propiedades exigentes		

Figura 4. Distinción entre Identificación y tipado.

Una visión general de la distinción entre la identificación y tipificación de microorganismos; "tipo" se refiere a las diferentes categorías de uso común para la delimitación sub-específica, por ejemplo: propiedades físicas observables (fenotipo); la morfología de las colonias (morfortipo), la composición química y los metabolitos producidos (quimiotipo); reacción antigénica (serotipo); patogenicidad (patotipo); adaptación a los ecosistemas (ecotipo); composición genética (genotipo); etc.

## 1.4. Aspectos esenciales de la Espectrometría de masas (MS)

### 1.4.1. Breve reseña histórica de la MS

La historia de la ciencia muestra claramente que la Espectrometría de Masas (MS) tiene sus raíces en la física desde hace más de 100 años, ramificándose a la química y en las últimas dos décadas ha incursionado en la biología, siguiendo en plena evolución.

La historia de la MS comienza ligada a la *física*, con Don Joseph John Thompson que llevó al descubrimiento del electrón en 1897 (Jordana-Lluch, 2012) (Ayala Bretón Camilo de Regil Hernández, 2004) por el cual le fue otorgado el Premio Nobel en Física en 1906. En la primera década del siglo veinte, Thompson construyó el primer espectrómetro de masas (llamado entonces Espectrógrafo de parábola), en el cual los iones eran separados por sus distintas trayectorias parabólicas en campos electromagnéticos y la detección era registrada por los choques de los iones en una pantalla fluorescente o en una placa fotográfica. Posteriormente, Francis W. Aston (Premio Nobel en Química en 1922), diseñó un

espectrómetro de masas que mejoró la resolución en un orden de magnitud, permitiendo a Aston estudiar isótopos y Dempster, A. J. de la Universidad de Chicago también mejoró la resolución con un analizador magnético y desarrolló la primera fuente de impacto electrónico, la cual ioniza moléculas volatilizadas con un rayo de electrones.

Thompson, Aston y Dempster sentaron una sólida base para la teoría de la MS y el diseño instrumental, haciendo posible, para aquellos que siguieron, desarrollar instrumentos capaces de reunir las demandas de los químicos y biólogos.

Es en el campo de la *química* donde más esfuerzo se le ha dedicado, con el fin de crear un instrumento con suficiente precisión para el análisis tanto de elementos como de pequeñas moléculas orgánicas. Se desarrollaron cuatro líneas: 1) Los Sectores magnéticos de doble enfoque, desarrollado por Alfred O.C. Nier; 2) el análisis por Tiempo de Vuelo (TOF), fue introducido por William E. Stephens en 1946; 3) Filtro Cuadrupolo, en 1950 fue reportado por primera vez por Wolfgang Paul, y acoplado con Cromatografía de Gases (GC) y, más recientemente, con Cromatografía de Líquidos. Años más tarde, Paul, recibió de manera compartida el Premio Nobel en Física por su trabajo en la trampa de iones; 4) Los analizadores de masa por Transformada de Fourier de Resonancia Ion Ciclotrón (FTICR) han sido la solución al problema de la alta resolución y precisión. Esta técnica fue descrita inicialmente por Hipple, J.A. y colegas. En 1974, Melvin, B. Comisarow y Marshall, Alan G. desarrollaron la técnica Transformada de Fourier ICR/MS (FTICR/MS); la mayor ventaja de la FTICR/MS fue que se logró una precisión de subppm (sub partes por millón) con los equipos comerciales (Ayala, 2004).

Durante muchos años, las aplicaciones de la MS estuvieron limitadas a compuestos de bajo peso molecular, termoestables y fácilmente volatilizables, sin embargo, en la década de los 80, con la aparición de las llamadas técnicas de ionización suave, electrospray (ESI) y desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz (MALDI), se consiguió el análisis de proteínas de alto peso molecular, termolábiles y poco volátiles permitiendo a la MS evolucionar hacia las áreas de la biología. Mediante estas técnicas los componentes de una mezcla compleja se ionizan sin sufrir apenas fragmentaciones, lo cual

simplifica los espectros de masas. Por su trabajo en el desarrollo de las técnicas de ionización suave, las cuales son adecuadas para el análisis de grandes biomoléculas, John B. Fenn (puso en práctica la técnica ESI/MS) y Koichi Tanaka (junto con colaboradores de la empresa Shimadzu y Frnz Hillenkamp y Michael Karas en la Universidad de Frankfurt) (técnica MALDI) compartieron el Premio Nobel en Química en 2002. ESI y MALDI han hecho que la MS sea cada vez más útil para experimentos biológicos sofisticados como la secuenciación y análisis de péptidos y proteínas, secuenciación de DNA y el análisis e identificación de microorganismos.

#### 1.4.2. Fundamentos

La MS es una técnica basada en la separación de iones de acuerdo con su relación masa-carga ( $m/z$ ) en presencia de campos eléctricos y/o magnéticos que proporciona información sobre la composición química de un compuesto.

Un espectrómetro de masas está formado por tres elementos básicos (ver figura 5): 1) fuente de ionización, donde a partir de la muestra se forma un haz de iones en estado gaseoso, generados por exceso o pérdida de electrones, o bien por formación de aductos, por lo que dichas moléculas estarán cargadas eléctricamente; 2) analizador de masas, que es el componente que separa los iones por su relación masa/carga ( $m/z$ ) (Fernández, 2010) y 3) detector de los iones previamente separados (Bougnoux, 2013). Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada y ampliada. A partir de la información recogida por el detector, se genera un espectro de masas; en el eje de ordenadas del espectro,  $y$ , se representan los valores de la relación  $m/z$ , mientras que en el eje de las abscisas,  $x$ , se representa la intensidad relativa de la señal, que refleja el número de iones de una determinada relación  $m/z$  que ha impactado contra el detector (Jordana-Lluch, 2012) (Fernández Olmos, 2010).

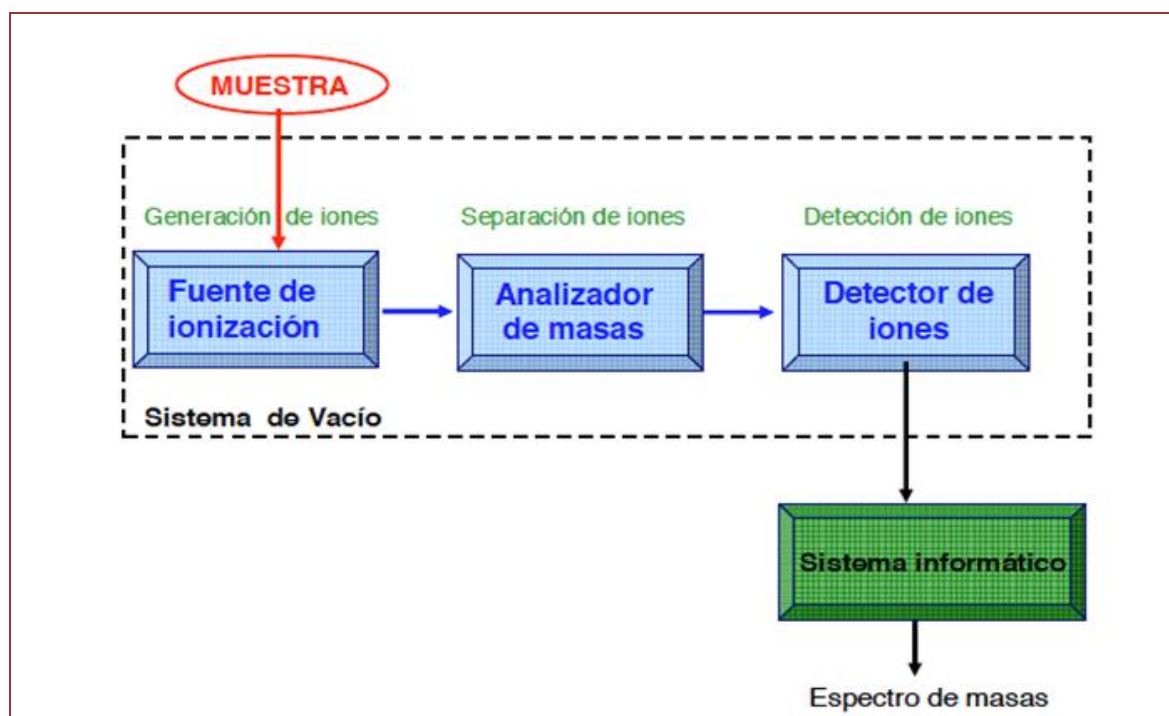


Figura 5. Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas.

### 1.4.3. Analizadores

El analizador es el componente principal del espectrómetro de masas y los parámetros clave en esta tecnología son la resolución, precisión, sensibilidad y la velocidad para producir espectros de masas (Jordana-Lluch, 2012). Los cuatro tipos de analizadores más utilizados para aplicaciones en MS son tiempo de vuelo (TOF), trampa de iones (IT), cuadrupolo (Q), y transformada de Fourier de resonancia ciclotrón de iones (FTICR); sin embargo, el más utilizado dentro del campo de la microbiología es el analizador tipo TOF. Existen diferentes diseños, cada uno tiene sus ventajas y limitaciones, pudiendo funcionar como equipos independientes o ser acoplados en tándem para generar instrumentos híbridos.

#### 1.4.3.1. Tiempo de vuelo (TOF)

##### 1.4.3.1.1. Fundamentos básicos

Los principios básicos de análisis de masas utilizando analizadores TOF son relativamente sencillos en comparación con muchos de los otros dispositivos típicos de análisis de masas.



Los iones se envían al analizador en pulsos cortos y se les aplica un potencial de aceleración; a continuación los iones vuelan a través del tubo de vuelo hasta el detector.

La velocidad de los iones depende de su masa (m) y de su carga (z), es decir, su relación m/z. En términos generales, para iones monocarga, cuanto mayor es la masa del ión, más lentamente se desplazan hacia el detector. (<http://www.chromacademy.com>, 2015)

#### 1.4.3.1.2. Ecuaciones del movimiento del TOF

La energía cinética adquirida por los iones tras la aplicación de un potencial se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$mv^2/zeV_1$$

Donde m, es la masa de ión; z, su número de cargas; v, su velocidad; V es el potencial aplicado y e, la carga del electrón. Por consiguiente:

$$v = \sqrt{2zeV_1/m}$$

Si la distancia entre la fuente y el detector es (d), el tiempo (t) que emplea el ión en desplazarse por el tubo es:

$$t = \frac{d}{v} = \frac{d}{\sqrt{2zeV_1}} = \frac{d\sqrt{m/z}}{\sqrt{2eV_1}} = K\sqrt{m/z}$$

En un analizador, la longitud del tubo de vuelo (d) es conocida, al igual que el valor de V. En consecuencia, el tiempo de vuelo, está relacionado directamente con la relación m/z, de acuerdo con la ecuación:

$$t = \frac{d}{v} = \frac{d\sqrt{m/z}}{\sqrt{2eV_1}} = K\sqrt{m/z}$$

Donde K es una constante que depende de d, e y V.  
(<http://www.chromacademy.com/>, 2015) (Santos, 2010).

#### 1.4.3.1.3. Resolución

En los analizadores TOF la resolución está limitada por dos factores importantes, que puede disminuir el poder de resolución del instrumento, especialmente en masas altas.

El primer problema es inherente a la naturaleza de la técnica analítica. La diferencia en los tiempos de vuelo entre dos iones que difieren en una unidad de masa disminuye al aumentar la masa:

$$t_m - t_{m+1} = \Delta t = \left[ \sqrt{m/z} - \sqrt{(m+1)/z} \right] \times K$$

El segundo problema se debe a que no todos los iones de la misma relación m/z son acelerados en el mismo punto dentro de la fuente de ionización y por tanto, los tiempos de llegada al detector no son iguales. Este problema se minimiza mediante el empleo del reflectrón.

#### 1.4.3.1.4. Modo lineal y reflectrón

El TOF lineal es el modo más comúnmente utilizado para el análisis de masas en muestras de microorganismos. El método TOF lineal tiene alta sensibilidad y alta eficiencia, con la capacidad de analizar moléculas en concentraciones del orden de femtomolar ( $10^{-15}$  mol / litro) y attomolar ( $10^{-18}$  mol / litro) (Ying-Sheng, 2015).

El reflectrón es un elemento de enfoque situado en el extremo del tubo de vuelo que cambia la dirección de desplazamiento de los iones y que consta de una serie de lentes a las que se aplica potenciales crecientes. Los iones con energía cinética mayor penetrarán el reflectrón más profundamente que aquellos con una energía cinética inferior, lo que permite igualar los tiempos de vuelo y la disminuir el ensanchamiento de pico con aumento de la resolución. El reflectrón produce una reducción del ensanchamiento de los picos del espectro de masas con aumento de resolución.

El empleo de modo lineal o reflectrón es función, principalmente, de la masa molecular del compuesto en estudio.

#### **1.4.3.1.5. Modo positivo y negativo**

Aunque al electrodo acelerador de iones se le puede aplicar un potencial positivo o negativo, en el trabajo con microorganismos usualmente se trabaja en modo ión positivo.

#### **1.4.3.2. Mención de otros analizadores: Cuadrupolo (Q), Trampa de iones (IT), Transformada de Fourier (FT)**

Aunque se dispone de otros analizadores, tales como trampa de iones, cuadrupolo y transformada de Fourier, el trabajo presente utiliza exclusivamente el TOF, en consecuencia para un estudio detallado se remite a la bibliografía (apartado 1.7).

### **1.5. MALDI-TOF MS**

La fuente de ionización más utilizada en el análisis de microorganismos mediante TOF es el MALDI. La técnica Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) es rápida y simple para la diferenciación de microorganismos, debido a la sencillez en la preparación de la muestra y bajo coste, en comparación con otras técnicas convencionales. (Fernández, 2012).

### **1.5.1. Preparación de muestra**

En el caso de levaduras, éstas tienen una pared celular gruesa, por lo cual es necesario una preparación de la muestra para favorecer la liberación de las proteínas intracelulares. El procedimiento de extracción con EtOH, ácido fórmico y ACN recomendado por el fabricante permite obtener espectros de masas de buena calidad para su análisis y proporciona altos niveles de identificación a nivel principalmente de género y especie. La función del EtOH es inactivar las levaduras y el AcF y el ACN provocan la disrupción de su pared. Una vez extraídas las proteínas se deposita la muestra sobre la placa MALDI, se deja secar y se cubre con la matriz. Existen otras metodologías más abreviadas de extracción directa de las proteínas en placa o análisis de células intactas que permiten identificar un porcentaje elevado de las levaduras representativas con menores tiempos de procesamiento de datos y costes de reactivos, en particular en el campo de la microbiología clínica, donde los tiempo de espera constituyen un factor importante (Relloso, 2015)(Demirev, 2001).

En el caso de la extracción directa de proteínas en placa se aplica una pequeña cantidad de una colonia de levadura directamente sobre la placa, se añade ácido fórmico sobre la muestra y posteriormente se cubre la matriz. Para el análisis de células intactas, se aplica la colonia de interés directamente sobre la placa MALDI, se cubre la muestra con la matriz y se deja secar al aire. Posteriormente, se introduce la placa en el instrumento para su análisis (Jordana, 2012).

### **1.5.2. Matrices**

En la técnica MALDI TOF, la muestra se mezcla con una matriz orgánica, capaz de cristalizar en contacto con el aire. Esta mezcla se deposita en una placa de un material conductor, denominada placa MALDI y es irradiada por un láser. La energía del láser causa una desestructuración de la matriz cristalizada generando una nube de iones y partículas donde la matriz dona un protón, en modo positivo, a la molécula analizada transformando está en ión (Van Baar, 2000). Los iones de dicha nube se extraen al ser sometidos a un campo eléctrico y son dirigidos hacia el tubo de vuelo.

La matriz es generalmente una sustancia orgánica que tiene principalmente tres funciones (Mateos, 1997): 1) separación y solvatación de moléculas de analito en la fase sólida, evitando su aglomeración; 2) absorción de la energía del laser utilizada para la desorción e ionización de la matriz y el analito; 3) ionización del analito, es decir, la protonación, mediante reacciones ácido/base en la fase gaseosa.

Algunas de las matrices más utilizadas son el Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), el ácido 2,5-dihidrobenczoico (2,5-DHB), Ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA) o el ácido sinapínico (SA).

### 1.5.3. Placas MALDI

Dependiendo del tipo de muestra, existen en el mercado diferentes placas MALDI. La casa comercial Bruker ofrece, placas de acero estándar y otras PAC de 800  $\mu\text{m}$  y 400  $\mu\text{m}$  (Bruker, [www.care-bdal.com](http://www.care-bdal.com), 2012).

Las placas Polished Steel y MP 384 Ground Steel (Bruker) están indicadas para el análisis de proteínas y péptidos; sin embargo la MTP 384 PAC está específicamente recomendada por Bruker para el análisis de microorganismos.

La placa de acero es estándar y permite una preparación de muestra rápida, simple y robusta de prácticamente todos los tipos e muestras (Clark, 2013). Existen disponibles dos tipos de placas de acero, simplemente de acero y de acero pulido, MP 384 Ground Steel y Polished Steel, respectivamente.

La PAC Estándar (800  $\mu\text{m}$ ) es un tipo de placa indicada para trabajo en modo automático. Este tipo de placa permite un alineamiento perfecto debido a las propiedades hidrófilas de las "anclas" que causan un efecto de auto-concentrado en el centro del pocillo durante el proceso de secado de la matriz. Esta auto-concentración que se consigue en las PAC, produce un efecto positivo para la generación de la señal durante el análisis en modo automático, lo que se traduce en la obtención de una mayor señal en un menor tiempo de

adquisición. Concretamente la placa MTP 384 PAC tiene una sensibilidad 30 veces superior a la MP 384 Ground Steel.

Existen otras dos modalidades de PAC; la PAC Estándar (400  $\mu\text{m}$ ), está dedicada a la preparación de oligonucleótidos y muestras similares usando 3-HPA como matriz. La placa AnchorChip pre-manchado (PAC) es desechable y altamente sensible a péptidos y otras muestras que requiere HCCA como matriz y ofrece seguridad con respecto a los efectos de memoria. Son adecuadas para muestras de complejidad media, por ejemplo, para aquellas provenientes de digestiones de proteínas a partir de geles 2D y similares. (Nordhoff, 2003) (Bruker, 2012).

#### **1.5.4. Calibrantes**

Previo al análisis de las muestra en MALDI TOF es necesario realizar una calibración para el ajuste de la masa y corrección de los parámetros del equipo, lo cual es una condición indispensable para obtener espectros de buena calidad.

Para la calibración del instrumento MALDI TOF, la casa comercial Bruker dispone de cuatro calibrantes, en función de la masa de las muestras. Estos calibrantes son, uno de péptidos, dos de proteínas en general, con distinto margen de masa, y uno específico, Bacterial Test Standard (BTS), para el análisis de microorganismos.

El calibrante utilizado en este trabajo se especifica en la parte experimental (apartado 3.3.2.)

#### **1.5.5. Librerías de espectros de masas**

En la actualidad se dispone de librerías comerciales de espectros de masas de microorganismos; cada una de estas librerías están asociadas y se manejan empleando software específicos de la casa comercial correspondiente. Estas librerías permiten la identificación de microorganismos por comparación de espectros de masas en diverso tipo de muestras, principalmente en el área de microbiología clínica (Suarez, 2015). Para la

elaboración de estas librerías, cada casa comercial utiliza sus parámetros normalizados y sus coeficientes de semejanza espectral.

Sin embargo, estas librerías comerciales, contienen escasa información sobre espectros de masas correspondientes a microorganismos relacionados con el área enológica.

#### **1.5.6. Equipamientos basados en espectrometría de masas MALDI-TOF para el análisis de microorganismos**

La utilización del MALDI-TOF MS para la identificación de microorganismos se remonta a unos 30 años, focalizada en el ámbito clínico (Relloso, 2015); sin embargo, en los últimos años han surgido varias casas comerciales que cada una recomienda sus propios protocolos para la preparación de la muestra y tiene asociada una base de datos diferente (Seng P., 2010), junto con un software para la adquisición de los espectros de masas y comparación con la base de datos (Lee, 2015) (Rosenvinge, 2012)(Fernández Olmos, 2010). Actualmente se han comercializado tres espectrómetros de masas MALDI-TOF que permiten la identificación de microorganismos: MicrobeLyns™ de Waters Corporation, MALDI BioTyper™ de Bruker Daltonics y AXIMA@SARAMIS™ de Shimadzu & Anagnostec. En la tabla 3, se resumen las principales características de los tres equipamientos (Fernández Olmos, 2010). Estos equipos tienen un precio que oscila entre 100.000 € y 200.000 €; sin embargo, considerando los reactivos a utilizar y el mantenimiento del equipo, el coste de la identificación se ha establecido en 1,43 €, mientras que la identificación bioquímica convencional tiene un coste que oscila entre 4,60 € y 8,23 €, y la identificación mediante la secuenciación del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S puede llegar a 137 €.(Rosselló, 2014) Por lo tanto, la técnica MALDI-TOF MS ofrece un coste reducido, en comparación con técnicas tradicionales (Seng, 2009) (Van Baar, 2000).

Tabla 3. Comparación de (Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure)

	Casa comercial		
	Waters Corporation	Bruker	Shimadzu
<i>Software y base de datos</i>	Microbe Lynx System - MMU (Manchester Metropolitan University)	Maldi Biotyper (Bruker Daltonics)	SARAMIS (AnagnosTec GmbH)
<i>Espectrómetro de masas</i>	Micro MX	Microflex Bruker	Axima
<i>Identificación</i>	Bacterias aerobias/anaerobias	Bacterias, levaduras y hongos filamentosos	Bacterias, levaduras y hongos filamentosos
<i>Análisis de espectro de masas</i>		Espectro de masas promedio	Superespectro
<i>Proteínas</i>	500-15.000 Da	2.000-20.000 Da	2.000-20.000 Da
<i>Preparación de la muestra</i>	Si	No	No
	Secado de 1 h	Secado inmediato	Secado inmediato
<i>Matriz</i>	Gram (+) solución saturada 3mg/ml de CMBT disuelto en H <sub>2</sub> O:MeOH:ACN (1:1:1) con 0,1M 18-crown-6-éter.  Gram(-): el CMBT se sustituye por 14 mg/ml de HCCA.	Solución saturada de HCCA en 50% ACN-2,5% TFA. Añadir 1 µl	2,5-DHB disuelto en una mezcla de H <sub>2</sub> O:EtOH:ACN (1:1:1) mix o de agua:ACN (1:1) con 0,03% de TFA. Añadir 0,3-1 µl.



<b>Rapidez</b>	96 muestras/1,5 h	96 muestras/1 h	380/5h
<b>Reproducibilidad</b>	Escasa (varía según medio de cultivo). 4 pocillos por muestra.	Elevada (no varía con el medio de	Elevada
<b>Transferencia de resultados al SIL*</b>	?	SI	SI
<b>Nº de pocillos en tarjeta</b>	96 pocillos	96 pocillos.	48 pocillos
<b>*SIL: sistema informático del laboratorio</b>			

\* CMBT:5-Cl-2-mercaptobenzotizol

### 1.5.7. Ventajas, limitaciones y futuras aplicaciones en MALDI-TOF MS

Las principales ventajas de la técnica MALDI-TOF MS son su rapidez, robustez y simplicidad para la diferenciación de microorganismos, con coste reducido, así como, sencillez en la preparación de la muestra, en comparación con las técnicas tradicionales (Seng, 2009) (Van Baar, 2000); además es una técnica fiable bajo condiciones variables y tiene una alta tasa de identificación microbiológica.

Aunque la técnica MALDI-TOF MS en la identificación de microorganismos tiene potencialidad para grandes desarrollos, aún existen limitaciones como son el escaso número de espectros de masas en las librerías comerciales relacionadas con microorganismos ambientales del campo de la enología. Además, existen microorganismos no cultivables y muestras con cepas mixtas que dificultan el análisis por esta técnica. Otro problema radica en la diferenciación de taxones estrechamente relacionados.

Instrumentalmente, uno de los principales problemas que presenta la técnica MALDI-TOF MS es la reproducibilidad en cuanto a la intensidad de las señales de los diferentes iones. Sin embargo, los nuevos avances en la tecnología y en los métodos de preparación de muestra, son prometedores en esta área. (Welker Martin, 2011)

## **1.6. La Espectrometría de masas, MALDI TOF, aplicada a la caracterización, clasificación e identificación de microorganismos basada en su perfil proteico: PROTEÓMICA**

La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas (proteoma) expresadas por un genoma. Las técnicas de proteómica que abordan el estudio de este conjunto de proteínas, se pueden clasificar principalmente en dos grupos en función del objetivo del estudio, 1) las técnicas empleadas para analizar globalmente el proteoma y separar sus proteínas, en especial la electroforesis bidimensional, 2D-DIGE (electroforesis diferencial en gel), ICAT (marcaje isotópico diferencial) y MudPIT (tecnología de identificación de proteínas multidimensional); 2) las técnicas usadas para analizar individualmente proteínas, estando en este grupo la MS (Fernández, 2010).

La evolución de la instrumentación de MS y de la bioinformática asociada, así como los numerosos desarrollos en las aplicaciones de la proteómica para analizar microorganismos y la creciente base de datos de secuencias del genoma microbiano, han proporcionado en conjunto un importante avance para la caracterización integral, clasificación e identificación de microorganismos (Karlsson, 2015). Por lo tanto, el análisis de las proteínas de un organismo se encuadra en el ámbito de la proteómica (Chalupová, 2014).

Concretamente, la técnica MALDI-TOF MS permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales (Pavlovic, 2013), a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada microorganismo y, por lo tanto, genera patrones de masa proteómicos (Intelicato-Young, 2013). Un microorganismo dado presentará siempre una serie de picos característicos en el espectro de masas, y esto permite la creación de bases de datos con los espectros de masas que presentan los distintos microorganismos (Bohme, 2010). El espectro de masas obtenido para un determinado microorganismo se puede comparar automáticamente con bases de datos ya existentes y el resultado se califica mediante un puntaje o *score* (Chalupová, 2014).

Las principales proteínas que definen el patrón de masa de una cepa dada de una especie son las proteínas ribosomales. El ribosoma es un orgánulo donde se produce la síntesis de proteínas mediante la traducción del ARNm (Graifer, 2014). Concretamente, en *S. cerevisiae* el ribosoma 80S activo consta de una pequeña subunidad 40S (SSU) que consiste en el ARN 18S ribosomal (ARNr) y 32 proteínas y una subunidad grande 60S (LSU) que incluye tres ARNr (25S, 5.8S, 5S) y 46 proteínas (Lu Hui, 2015).

Un espectro de masas correspondiente a una cepa de un microorganismo dado, contiene entre 70 y 200 picos, en un margen de masa entre 2.000 y 20.000 Da. Sin embargo, no todos los picos de masa se corresponden a proteínas ribosomales. Aproximadamente, 50 de esos picos corresponden a proteínas ribosomales, el resto son en su mayoría proteínas “estructurales”, es decir, proteínas que no tienen función catalítica pero que son parte constitutiva de la estructura y función de las células. (Welker Martin, 2011)

El hecho de que las proteínas ribosomales y estructurales representen el mayor número de los picos presentes en un espectro de masas típico de una cepa microbiana hace que los espectros de masas sean estables ya que el ribosoma es un orgánulo conservado y las proteínas ribosomales son componentes de todas las células vivas (Planta, 1998).

Por otra parte, las proteínas estructurales pueden ser consideradas como marcadores filogenéticos. En general, cuanto más relación filogenética existe entre dos microorganismos, más similitud existe entre sus espectros de masas. (Welke, 2011).

El proteoma de un microorganismo dado varía en función de varios factores como son, las condiciones de crecimiento del microorganismo, la temperatura y tiempo de incubación, el medio de cultivo, etc., por lo que es necesario mantener las condiciones experimentales para que los resultados obtenidos sean reproducibles. (Pavlovic, 2013). Sin embargo, el espectro de masas obtenido para una especie es en general bastante estable. (Welker Martin, 2011).

### **1.7. Antecedentes bibliográficos del análisis, identificación y clasificación de microorganismos por espectrometría de masas**

Un resumen de la bibliografía más relevante en el área de la identificación y clasificación de microorganismos se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Bibliografía más relevante en el área de identificación y clasificación de microorganismos

TECNICA ANALITICA	EQUIPAMIENTO	CAMPO	TIPO MUESTRA	MICROORGANISMO	PREPARACIÓN MUESTRA	REFERENCIA
<b>Py-GC-MS</b>	Espectrómetro de masas cuádrupolo 300 EAI	Ambiental	Material bioorgánico de suelo	<i>Micrococcus luteus</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	-	(Shulman, 1969) (Simmonds, 1970)
<b>Py-GC-MS</b>	Espectrómetro de masas cuádrupolo Pírolizador	Clínico	Bacterias	Bacterias patógenas	-	(Anhalt, 1975)
<b>Py-GLC</b>	Espectrómetro de masas CEC 21-111	Clínico	Bacterias liofilizadas	Bacterias liofilizadas	-	(Meuzelaar, 1973)
<b>RAMAN</b>	Microespectrómetro Raman System 1001	Clínico	Clínicas	Bacterias	-	(Mahmoud Hamasha, 2011)
<b>RAMAN</b>	Microespectrómetro Raman System 1000	Clínico	Muestras clínicas peritoneales	<i>Candida</i>	-	(Ibelings, 2004)
<b>2D-LC-MS/MS</b>	Espectrómetro de masas 2D-LC-MS/MS de Shimadzu	Clínico	Levaduras	<i>S. cerevisiae</i>	Digestión y preparación de fracciones de levadura	(Maynard, 2004)
<b>LC-MS/MS</b>	Espectrómetro de masas serie XCT 1.100 LC / MSD-trampa Agilent	Clínico	Muestras clínicas: heces, hisopo rectal, orina	<i>E. coli</i>	Purificación de proteínas	(Christner, 2014)
<b>LC/QTOF/MS</b>	QTOF Premier de Waters	Clínico	Cepas de laboratorio	<i>Escherichia coli</i> y <i>Shigella</i>	-	(Everley, 2008)
<b>Nano-LC-MS/MS</b>	Espectrómetro de masas NanoAquity de Waters	Clínico	Bacterias	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	(Pierce, 2011)
<b>Nano-ESI-MS</b>	Espectrómetro de masas NanoESI API III triple cuádrupolo Sciex	Clínico	Levaduras	Levaduras	Digestión de proteínas en gel	(Shevchenko, 1996)
<b>ESI-MS</b>	Espectrómetro de masas ESI-MS Micromass Ltd. LCT TOF	Clínico	Bacterias Gram-negativas y Gram-positivas	<i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus cereus</i>	Para ES <sup>+</sup> las bacterias se suspendieron en 50% de acetoniitrilo / agua (1% v / v de ácido fórmico), y para ES <sup>-</sup> se analizaron las muestras en 50% de isopropanol / agua.	(Goodacre, 1999)

FTIR	Espectrómetro de Tensor ™ 27 acoplado al dispositivo de alto rendimiento HTS-Xt de Bruker	-	Alimentos	Bacterias	-	(Wenning, 2014)
RMN	Bruker Avance 360-MHz RMN	Clínico	Levaduras	<i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i>	-	(Himmelreich U. S., 2005)
RMN	Bruker Avance 360-MHz RMN	Clínico	Levaduras	<i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , and <i>C. tropicalis</i>	-	(Himmelreich U. S.- M., 2003)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	-	Levaduras	Levaduras	Digestión de proteínas en gel	(Shevchenko, 1996)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	Ambiental	Vino	Levaduras	Extracción de proteínas	(Vogel, 2014)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	Ambiental	Uvas	Levaduras	Extracción de proteínas	(Agustini, 2014)
MALDI-TOF MS	BioMérieux Vitek MS versión 2.0	Clínico	Muestras clínicas	Bacterias y levaduras	Extracción de proteínas	(Westblade, 2015)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	Clínico	Muestras clínicas	Hongos	Extracción de proteínas	(Chen, 2015)
MALDI-TOF MS	AnagnosTec 'SARAMIS'	Clínico	muestras clínicas (piel)	Hongos (dermatofitos)	Extracción de proteínas	(Nenoff, 2013)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT y Sistema Vitek MS Anagnos-Tec Saramis	Clínico	Muestras clínicas patógenas	Levaduras	Extracción de proteínas	(Bader, 2011), (Chao, 2014), (Jamal W. A., 2014)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	Clínico	Clínicas	Levaduras	Extracción de proteínas	(Panda, 2015), (Marklein, 2009)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	Clínico	Clínicas	Bacterias y levaduras	Extracción de proteínas	(Relloso, 2015), (Van Veen, 2010)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	Clínico	Cultivo de sangre	Bacterias y levaduras	Extracción de proteínas	(Jamal W. Y., 2013)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Autoflex III Smartbeam	Clínico	Clínicas	<i>E.coli</i>	Extracción de proteínas	(Clark C. K., 2013)

MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	Clínico	Aislados clínicos	Levaduras	Extracción de proteínas	(Pinto, 2011)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	Clínico	Aislados clínicos (sangre, orina, pus, biopsia, hisopo, líquido cefalorraquídeo, las vías respiratorias y las muestras de la herida)	Levaduras y hongos filamentosos	Extracción de proteínas	(Panda, 2015)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Autoflex III Smartbeam	Industrial	Cepas de laboratorio-origen industrial	<i>S. cerevisiae</i>	Extracción de proteínas	(Moothoo-Padayachie, 2013)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Biotyper, Microflex LT	Industrial	cepas de laboratorio	<i>S. cerevisiae</i>	Extracción de proteínas	(Blättel, 2013)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Biotyper, Microflex LT	Industrial	Bebidas contaminadas	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>Diastaticus</i> , <i>Wickerhamomyces anomalus</i> y <i>Debaryomyces hansenii</i>	Varios- optimización de parámetros	(Usbeck, 2013)
MALDI-TOF MS	Espectrómetro de masas MALDI-TOF MS Microflex de Bruker	-	Alimentos	Bacterias	Extracción de proteínas	(Wenning, 2014)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Biotyper	Clínico	Hemocultivos	Bacterias	Extracción de proteínas	(Goncalves de Freitas, 2012)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Biotyper, Microflex LT	Clínico	Muestras clínicas: heces, hisopo rectal, orina	<i>E. coli</i>	Extracción de proteínas	(Christner, 2014)
MALDI-TOF MS	Espectrómetro de masas MALDI-TOF MS Ultraflex II de Bruker	Clínico	Cepas de laboratorio	<i>Escherichia coli</i> y <i>Shigella</i>	Extracción de proteínas	(Everley, 2008)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	Ambiental	Cepas de laboratorio	Levaduras	Extracción de proteínas	(Agustini, 2014)
MALDI-TOF MS	Bruker Biotyper, Microflex LT	Clínico	Clínicas (sangre, líquido cefalorraquídeo, y peritoneo)	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Rhodotorula</i> , y <i>Saccharomyces</i>	Extracción de proteínas	(De Carolis, 2014)

<b>MALDI-TOF MS</b>	Bruker Biotyper, Microflex LT	Clínico	Clínicas (orina y hemocultivo)	Bacterias y levaduras	Extracción de proteínas	<b>(March Rosselló, 2012)</b>
<b>MALDI-TOF MS</b>	Bruker Biotyper, Autoflex I	Clínico	Clínicas (piel, raspados ungueales, córnea, sangre, líquido de lavado bronco alveolar)	<i>Fusarium spp</i>	Extracción de proteínas	(Marinach Patrice, 2009)



# Capítulo 2

---

## OBJETIVOS



## CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

El objetivo genérico de la tesis se centra en el empleo de MALDI-TOF MS como técnica alternativa a las técnicas clásicas y moleculares disponibles en la bibliografía para simplificar la identificación y taxonomía de levaduras de interés enológico.

- Para cumplir este objetivo se plantean diferentes objetivos parciales:
- Análisis, diferenciación e identificación de especies y cepas de levaduras de tipo *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* mediante técnicas clásicas y moleculares.
- Optimización de variables relacionadas con la técnica MALDI-TOF MS que afectan a la reproducibilidad y calidad de los espectros de masas de las levaduras.
- Obtención de espectros de masas MALDI-TOF MS mediante el análisis de cepas de los géneros *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, más representativos del ámbito enológico.
- Creación de una librería de espectros de masas MALDI-TOF de cepas de levaduras de interés enológico, de los grupos *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, de uso abierto a la comunidad científica, con el fin de disminuir las limitaciones que presentan las casas comerciales para el uso de sus software.
- Desarrollo de un programa matemático para llevar a cabo el procesamiento de espectros de masas y creación de espectros de masas sintéticos de cepas de levadura.
- Optimización de variables que maneja el programa estadístico en lenguaje de programación R utilizado para la detección de las líneas representativas de cada espectro de masas.
- Validación de la librería.
- Diferenciación de levaduras enológicas a nivel de especie y de cepa a partir de sus espectros de masas MALDI-TOF MS.
- Diferenciación mediante el empleo de la técnica MALDI-TOF MS de dos especies del género *Metschnikowia*, *M. fructicola* y *M. pulcherrima*, cuya distinción mediante técnicas clásicas y moleculares presenta dificultades.



# Capítulo 3

---

PARTE EXPERIMENTAL



## CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. Bodegas y Denominaciones de Origen (D.O.) para la toma de muestra

Las levaduras utilizadas en este estudio fueron aisladas durante vendimias consecutivas de los años 2011 a 2014, a partir de de mostos procedentes de diferentes fincas de cuatro bodegas, que pertenecen a tres D.O.; concretamente las Bodegas **Emilio Moro** y Bodegas **Pago de Carraovejas**, pertenecen a la D.O. Ribera de Duero, la Bodega **Ossian**, pertenece a la D.O. Rueda y la Bodega **Gordonzello S.A.**, a la D.O. Tierra de León.

#### 3.1.1. Denominación de origen Ribera del Duero

Los vinos bajo la Denominación de Origen Ribera del Duero son de los más longevos de España, incluyen desde los rosados y jóvenes tintos a los envejecidos. La elaboración de los vinos protegidos se realiza con uvas de las siguientes variedades: Tinta del País, Cabernet, Sauvignon, Garnacha tinta, Malbec, Merlot y Albillo.

Las especiales condiciones de la zona de producción de los vinos de la Ribera del Duero se unen a las características propias de la variedad Tempranillo que en esta zona se la conoce como Tinto Fino o Tinta del País. Esta variedad es la mayoritaria en los vinos de Ribera de Duero ([www.cerespain.com](http://www.cerespain.com), 2001-2015).

##### 3.1.1.1. Emilio Moro, en Pesquera de Duero

Los viñedos se encuentran situados en el municipio de Pesquera de Duero (Valladolid), dentro de la D.O. Ribera del Duero.

Las fincas en las que se han aislado cepas de *Saccharomyces cerevisiae* han sido: Camino Viejo, Horcajo, La Mira, Llanos de Santiago, Malabrigo, Proyectos, y Valderramiro.

Las fincas en las que se han aislado cepas de no-*Saccharomyces* han sido: Camino Viejo, Camino Viejo Alto, Horcajo, Moradillo y Valderramiro.

### 3.1.1.2. Pago de Carraovejas, en Peñafiel

Los viñedos se encuentran situados en el municipio de Peñafiel (Castilla León), dentro de la D.O. Ribera del Duero. La ubicación estratégica de las fincas, cruce de ríos, la protección por un cerro de los fríos vientos del Norte, la barrera que forma el castillo de Peñafiel frente a las nubes de granizo y por último la intervención humana, mediante molinos anti helada y los sistemas de riego mitigan los efectos de la helada y evitan el congelamiento interno de la vegetación, haciendo que estas fincas produzcan una uva de alta calidad. Las tres variedades de uva empleadas en la elaboración de los vinos en esta bodega son Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Merlot.

Las fincas en las que se han aislado cepas de no-*Saccharomyces* han sido, utilizando los códigos de la bodega, A-2, A-3, PDC T3, PDC-11, PDC-12, PDC6 alta, PDC6 baja, PSD-018 PDC1, PSD-029 PDC11, PSD-029 PDC9 II, PSD-031M PDC13, PSD-036 PSTM2, PSD-062 Vallejos 3, PSD-063, PSD-068, PSTM5 y T-2.

### 3.1.2. Denominación de Origen Rueda

La Denominación de Origen Rueda fue la primera Denominación de Origen reconocida en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, en enero de 1980; con ello se protegió su variedad autóctona: la Verdejo. Esta variedad de uva lleva cultivándose en la zona desde el siglo XI y fue clave para conseguir dicho reconocimiento.

Las otras variedades reconocidas para la elaboración de vinos blancos son: Viura, Sauvignon Blanc y Palomino Fino. Completan el panorama vitícola las variedades Tempranillo, Cabernet Sauvignon, Merlot y Garnacha de las que se obtienen vinos tintos y rosados. La zona de producción es muy amplia pero la mayor concentración de viñedos se encuentran en los municipios de La Seca, Rueda y Serrada.



### 3.1.2.1. Ossian, en Nieva

Los viñedos prefiloxéricos de esta bodega tienen entre 100 y 200 años y se encuentran en el municipio de Nieva (Segovia), dentro de la D.O. Rueda. Los suelos de esta zona son variados, algunas zonas son de pizarra, otras de arcilla y otras de canto rodado de antiguas terrazas de río.

Las fincas en las que se han aislado cepas de *Saccharomyces cerevisiae* han sido nombradas con los códigos de la propia bodega: 19.6 995, 20.2 1008, 36.4 1022, 36.7 986, 37.2 1031, 38.1 1056, 38.1 994, 38.2 992,3 9.2 1005, 39.2 997, 8.3 988, 8.5 Casi final, Alte L.27 1030, Alte L.27 Tiempo Final, Capitel L.44.4 Tiempo Final, Carril L.38 1054, Carril L.38 Tiempo Final, D2 996, L12 Casi final, Navales L.47.2 1052

Las fincas en las que se han aislado cepas de no-*Saccharomyces* han sido: Alto Camino, Capitel, Carril, KPK, KPL, L20, Navales, QL1, Saravia.

### 3.1.3. Denominación de Origen Tierra de León

La variedad principal de la cual se obtienen la mayoría de los vinos tintos de la Denominación de Origen Tierra de León es la Prieto Picudo. Es una variedad autóctona de esta zona. Se obtienen unos vinos tintos con un ligero parecido a los de la variedad Tempranillo. El racimo de la variedad Prieto Picudo es apretado y las bayas tienen forma de piñones con la piel negra azulada. La variedad Prieto Picudo es autóctona de la zona de Valdevimbre, Los Oteros y la ribera del río Cea ocupan una extensión de algo más de 3.000 hectáreas de viñedos.

Hasta ahora las cepas tenían las ramas extendidas por el suelo, por lo que la poda es diferente a cualquier otro lugar. En la actualidad, las nuevas plantaciones se colocan en espaldera para mejorar la producción ([www.cerespain.com](http://www.cerespain.com), 2001-2015).

### 3.1.3.1. Bodegas Gordonzello S.A., en Gordoncillo

Los viñedos se encuentran situados en el municipio de Gordoncillo (León) y pertenecen a la D.O. Tierra de León. Cuenta con 205 ha de viñedo propio dividido en 8 fincas o parcelas, diferenciadas por el tipo de variedad y orientación, lo que garantiza una maduración y vendimia más progresiva.

Las fincas en las que se han aislado cepas de *Saccharomyces cerevisiae* han sido: Casa Mazo, El Hoyo, La Viuda, La Viuda (El Jano).

Las fincas La Viuda, el Jano, Casa Mazo y el Hoyo contienen la variedad Prieto Picudo; la finca el cervato, la variedad Verdejo; la finca el Pichón, la variedad Mencía; la finca Costana, la variedad Tempranillo; la finca Calabazanos contiene tres variedades Albarín, Verdejo y Tempranillo.

## 3.2. Muestras de levaduras

### 3.2.1. Aislamiento y selección

En este trabajo se han aislado un total de 1665 cepas de levadura pertenecientes a dos grupos, por un lado cepas del género *Saccharomyces*, concretamente de la especie *S. cerevisiae*, aisladas en la fase de fermentación y posteriormente seleccionadas para el estudio de diferenciación a nivel de cepa y por otro lado cepas pertenecientes a especies de géneros no-*Saccharomyces*, aisladas en estadios previos a la fermentación y posteriormente seleccionadas para el estudio de diferenciación a nivel de especie. Los aislamientos fueron realizados en su mayor parte en el grupo de investigación que dirige el Dr. Antonio Santos de la Sen perteneciente al departamento de Microbiología III de la Facultad de Biología de la UCM formando parte de una extensa colección de microorganismos conservada en este departamento.

### 3.2.1.1. Cepas género *Saccharomyces*

Las cepas de levaduras del género *Saccharomyces* se aislaron a partir de los mostos en fermentación procedentes de las cuatro bodegas descritas en el apartado 3.1. Se extrajeron muestras a dos densidades del mosto, 1040 y 1020 g/L. Estos valores de densidad permiten garantizar con una alta probabilidad que los aislamientos de levaduras que se realizarán pertenecerán a la especie *S. cerevisiae*, ya que prácticamente es la única especie de levadura capaz de desarrollarse a concentraciones de alcohol correspondientes a esas densidades (Pretorius, 2000) (Álvarez-Pérez, 2012).

A partir de las muestras extraídas se sembraron en medio YMA alícuotas de 1 mL procedentes de un banco de diluciones decimales de los mostos en fermentación. Tras incubar a 28°C durante 48 horas, se seleccionaron al azar colonias en número suficiente para garantizar unos resultados representativos de la variabilidad de las cepas de *S. cerevisiae* presentes en las fermentaciones (20 colonias por cada región/fermentación, 10 de cada densidad). Estas colonias fueron aisladas de las placas inoculadas con las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ , ya que fueron las únicas que presentaron un número de colonias de levaduras suficientes y, al mismo tiempo, bien aisladas. Las colonias seleccionadas fueron aisladas y cultivadas en medio Agar Sabouraud-Cloranfenicol-Rosa de bengala durante 48 horas a 28°C. Se aislaron un total de 880 cepas del género *Saccharomyces*, especie *S. cerevisiae*.

En la selección de cepas de levadura de la especie *S. cerevisiae*, de los 880 aislamientos realizados, y tras el análisis genético de los polimorfismos de la región interdelta, se identificaron visualmente un total de 224 polimorfismos diferentes en base al perfil electroforético (presencia, ausencia e intensidad de bandas) en geles de agarosa y se clasificó cada tipo de perfil polimórfico con una o dos letras identificativas dentro de cada bodega y finca seleccionando una cepa de cada uno como representante de cada polimorfismo encontrado. A su vez, de los 224 polimorfismos diferentes encontrados se seleccionaron un total de 98 cepas para su análisis mediante MALDI-TOF MS, existiendo entre ellos representantes de todas las bodegas, fincas y años de vendimia. En la tabla 5 se muestra la distribución total de polimorfismos encontrados en la especie *S. cerevisiae* en

relación a cada una de las bodegas estudiadas y sus fincas, así como las cepas seleccionadas para su análisis mediante MALDI-TOF MS (identificadas con un signo + en la columna MALDI de la tabla 5).

Tabla 5 . Listado de 98 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas para su análisis mediante MALDI-TOF MS y 224 polimorfismos detectados

Especie	Polimorfismo	Cepa	Bodega	Finca	Año	MALDI
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-B	7	Emilio Moro	Camino Viejo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-D	10	Emilio Moro	Camino Viejo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-E	11	Emilio Moro	Camino Viejo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-H	25	Emilio Moro	Camino Viejo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-I	26	Emilio Moro	Camino Viejo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-F	27	Emilio Moro	Camino Viejo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-G	32	Emilio Moro	Camino Viejo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-C	34	Emilio Moro	Camino Viejo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-A	37	Emilio Moro	Camino Viejo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-J	40	Emilio Moro	Camino Viejo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-K	221	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-N	225	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-O	230	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-P	232	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-Q	234	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-R	235	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-S	236	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-T	238	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-U	240	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-L	241	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-M	244	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-V	246	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-W	247	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-X	248	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-Y	250	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-Z	251	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-AI	254	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-BI	255	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-CI	258	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-CV-DI	259	Emilio Moro	Camino Viejo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-HO-B	125	Emilio Moro	Horcajo	2013	+

Especie	Polimorfismo	Cepa	Bodega	Finca	Año	MALDI
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-HO-A	127	Emilio Moro	Horcajo	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-HO-D	128	Emilio Moro	Horcajo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-HO-E	129	Emilio Moro	Horcajo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-HO-F	132	Emilio Moro	Horcajo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-HO-C	134	Emilio Moro	Horcajo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-B	106	Emilio Moro	La Mira	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-C	107	Emilio Moro	La Mira	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-D	109	Emilio Moro	La Mira	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-E	112	Emilio Moro	La Mira	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-F	113	Emilio Moro	La Mira	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-G	114	Emilio Moro	La Mira	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-H	115	Emilio Moro	La Mira	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-A	117	Emilio Moro	La Mira	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-I	118	Emilio Moro	La Mira	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-J	261	Emilio Moro	La Mira	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-K	262	Emilio Moro	La Mira	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-N	266	Emilio Moro	La Mira	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-P	271	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-Q	273	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-S	275	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-L	282	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-T	284	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-U	286	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-O	287	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-V	288	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-W	289	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-X	291	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-Y	292	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-M	294	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-Z	295	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-AI	296	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LM-R	299	Emilio Moro	La Mira	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-B	302	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-D	304	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-E	305	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-G	310	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-H	311	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+

Especie	Polimorfismo	Cepa	Bodega	Finca	Año	MALDI
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-I	313	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-J	314	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-K	316	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-L	317	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-M	318	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-O	321	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-P	322	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-A	323	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-C	325	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-N	326	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-U	327	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-F	328	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-Q	333	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-R	334	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-S	338	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-LS-T	339	Emilio Moro	Llanos de Santiago	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-A	81	Emilio Moro	Malabrigo	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-B	82	Emilio Moro	Malabrigo	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-C	83	Emilio Moro	Malabrigo	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-F	86	Emilio Moro	Malabrigo	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-G	87	Emilio Moro	Malabrigo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-H	89	Emilio Moro	Malabrigo	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-D	91	Emilio Moro	Malabrigo	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-I	93	Emilio Moro	Malabrigo	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-J	94	Emilio Moro	Malabrigo	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-K	99	Emilio Moro	Malabrigo	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-E	100	Emilio Moro	Malabrigo	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-L	181	Emilio Moro	Malabrigo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-M	182	Emilio Moro	Malabrigo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-O	184	Emilio Moro	Malabrigo	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-P	185	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-Q	187	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-R	188	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-T	191	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-W	196	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-V	197	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-X	198	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-N*	200	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-

Especie	Polimorfismo	Cepa	Bodega	Finca	Año	MALDI
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-Y	201	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-Z	203	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-AI	204	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-BI	205	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-CI	207	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-DI	208	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-S	211	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-EI	212	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-FI	214	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-GI	216	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-HI	218	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-MA-U	219	Emilio Moro	Malabrigo	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-A	341	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-B	342	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-D	344	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-E	345	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-H	349	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-P	350	Emilio Moro	Proyectos	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-I	352	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-K	356	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-Q	360	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-F	361	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-J	364	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-L	367	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-G	368	Emilio Moro	Proyectos	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-C*	369	Emilio Moro	Proyectos	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-M	370	Emilio Moro	Proyectos	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-N	374	Emilio Moro	Proyectos	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-R	376	Emilio Moro	Proyectos	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-PR-O	380	Emilio Moro	Proyectos	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-A	41	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-C	42	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-B	43	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-D	44	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-F	46	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-H	51	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-I	52	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-G	53	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-J	64	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-K	66	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-L	67	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-M	73	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-

Especie	Polimorfismo	Cepa	Bodega	Finca	Año	MALDI
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-O	75	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-N	77	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-E	80	Emilio Moro	Valderramiro	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-P	141	Emilio Moro	Valderramiro	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-S	151	Emilio Moro	Valderramiro	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-T	155	Emilio Moro	Valderramiro	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-U	157	Emilio Moro	Valderramiro	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-W	162	Emilio Moro	Valderramiro	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-V	163	Emilio Moro	Valderramiro	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-Q	170	Emilio Moro	Valderramiro	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-EM-VR-R	175	Emilio Moro	Valderramiro	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-F	37	Gordonzello	Casa Mazo	2011	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-G	38	Gordonzello	Casa Mazo	2011	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-Q	89	Gordonzello	Casa Mazo	2012	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-N	91	Gordonzello	Casa Mazo	2012	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-R	93	Gordonzello	Casa Mazo	2012	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-J	45	Gordonzello	El Hoyo	2011	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-H	54	Gordonzello	El Hoyo	2011	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-K	57	Gordonzello	El Hoyo	2011	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-C	5	Gordonzello	La Viuda	2011	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-A	6	Gordonzello	La Viuda	2011	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-D	9	Gordonzello	La Viuda	2011	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-E	12	Gordonzello	La Viuda	2011	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-B	15	Gordonzello	La Viuda	2011	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-S	102	Gordonzello	La Viuda(El Jano)	2012	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-O	113	Gordonzello	La Viuda(El Jano)	2012	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-T	118	Gordonzello	La Viuda(El Jano)	2012	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-P	119	Gordonzello	La Viuda(El Jano)	2012	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-G-U	120	Gordonzello	La Viuda(El Jano)	2012	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-H	21	Ossian	19.6 995	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-I	24	Ossian	19.6 995	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-J	26	Ossian	19.6 995	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-K	29	Ossian	19.6 995	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-L	38	Ossian	19.6 995	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-M	40	Ossian	19.6 995	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-N	47	Ossian	20.2 1008	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-O	56	Ossian	20.2 1008	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-P	58	Ossian	20.2 1008	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-Q	64	Ossian	36.4 1022	2013	+



Especie	Polimorfismo	Cepa	Bodega	Finca	Año	MALDI
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-R	70	Ossian	36.4 1022	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-S	74	Ossian	36.4 1022	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-EI	207	Ossian	36.7 986	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-T	92	Ossian	37.2 1031	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-U	110	Ossian	38.1 1056	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-Y	154	Ossian	38.1 994	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-Z	159	Ossian	38.1 994	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-BI	166	Ossian	38.2 992	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-AI	168	Ossian	38.2 992	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-V	121	Ossian	39.2 1005	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-W	122	Ossian	39.2 1005	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-X	143	Ossian	39.2 997	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-A	1	Ossian	8.3 988	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-B	5	Ossian	8.3 988	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-C	10	Ossian	8.3 988	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-D	11	Ossian	8.3 988	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-G	14	Ossian	8.3 988	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-F	15	Ossian	8.3 988	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-E	16	Ossian	8.3 988	2013	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-CI	182	Ossian	8.5 Casi final	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-GI	233	Ossian	Alte L.27 1030	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-JI	302	Ossian	Alte L.27 Tiempo Final	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-II	319	Ossian	Alte L.27 Tiempo Final	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-LI	320	Ossian	Alte L.27 Tiempo Final	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-QI	323	Ossian	C L.44.4 Tiempo Final	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-RI	326	Ossian	C L.44.4 Tiempo Final	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-SI	331	Ossian	CL.44.4 Tiempo Final	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-TI	335	Ossian	CL.44.4 Tiempo Final	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-MI	275	Ossian	C L.38 1054	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-UI	353	Ossian	CL.38 Tiempo Final	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-DI	203	Ossian	D2 996	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-FI	213	Ossian	L12 Casi final	2013	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-HI	283	Ossian	Navales L.47.2 1052	2014	-
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-NI	285	Ossian	Navales L.47.2 1052	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-KI	286	Ossian	Navales L.47.2 1052	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-OI	289	Ossian	Navales L.47.2 1052	2014	+
<i>S. cerevisiae</i>	S-O-PI	290	Ossian	Navales L.47.2 1052	2014	+

### 3.2.1.2. Cepas género no-*Saccharomyces*

El aislamiento de cepas de levaduras de especies pertenecientes a géneros no-*Saccharomyces* se realizó a partir mostos recién obtenidos de racimos de uva procedentes de las cuatro bodegas descritas (apartado 3.1). Después de 24h a 4°C, tras exprimir las uvas

obtenidas, se procedió a realizar el aislamiento de levaduras no-*Saccharomyces*. El mosto obtenido se diluyó mediante diluciones seriadas decimales en solución salina (NaCl 0,9%) y se sembró 0,1 mL del mosto diluido en medio de lisina. Tras 48-72h de incubación a 30°C se aislaron las colonias y se sembraron en medio YMA para su posterior almacenamiento en la colección de levaduras criocongeladas a -80°C en medio de criocongelación. Se aislaron un total de 785 cepas de especies de géneros no-*Saccharomyces* pertenecientes a 16 especies diferentes.

Dentro de este grupo no-*Saccharomyces* están incluidas, erróneamente, cepas del género *Saccharomyces*, que fueron aisladas en el medio lisina, específico para no-*Saccharomyces*. Aunque su selectividad no es absoluta, y algunas cepas de *S. cerevisiae* son capaces de desarrollarse, aunque lentamente, en ese medio. Estas cepas fueron identificadas mediante técnicas moleculares como *S. cerevisiae*.

La selección de cepas no-*Saccharomyces* se realizó de forma que existieran representantes de todas las especies aisladas para su secuenciación y análisis mediante MALDI-TOF MS. Se seleccionaron un total de 118 cepas no-*Saccharomyces* que representan entre el 5-10% de los aislamientos para cada especie. En la tabla 6 se muestra un listado de las cepas de no-*Saccharomyces* seleccionadas.

Tabla 6. Listado de 118 cepas no-*Saccharomyces* seleccionadas para su análisis mediante MALDI-TOF MS

Cepa	Especie	Bodega	Finca	Año
NS-O-70	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Ossian	Alto Camino	2013
NS-O-73	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Ossian	Alto Camino	2013
NS-O-82	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Ossian	Alto Camino	2013
NS-O-105	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Ossian	Navales	2013
NS-PDC-121	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pago de Carraovejas	PSD-062 Vallejos 3	2014
NS-PDC-125	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pago de Carraovejas	PSD-062 Vallejos 3	2014
NS-PDC-129	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pago de Carraovejas	PSD-062 Vallejos 3	2014
NS-PDC-134	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pago de Carraovejas	PSD-062 Vallejos 3	2014
NS-PDC-135	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pago de Carraovejas	PSD-062 Vallejos 3	2014
NS-PDC-261	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	Pago de Carraovejas	PDC T3	2014
NS-PDC-262	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	Pago de Carraovejas	PDC T3	2014
NS-PDC-243	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	Pago de Carraovejas	PDC12	2014

Cepa	Especie	Bodega	Finca	Año
NS-PDC-248	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	Pago de Carraovejas	PDC12	2014
NS-PDC-249	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	Pago de Carraovejas	PDC12	2014
NS-PDC-254	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	Pago de Carraovejas	PDC12	2014
NS-PDC-257	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	Pago de Carraovejas	PDC12	2014
NS-PDC-132	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	Pago de Carraovejas	PSD-062 Vallejos 3	2014
NS-PDC-178	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	Pago de Carraovejas	PSD-068	2014
NS-G-15	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-16	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-20	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-23	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-4	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-5	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-7	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-8	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-33	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-35	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-39	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-40	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-43	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-47	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-49	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-51	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-53	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-56	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-EM-CV-1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Emilio Moro	Camino Viejo	2013
NS-EM-CV-25	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Emilio Moro	Camino Viejo	2013
NS-EM-VR-101	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Emilio Moro	Valderramiro	2014
NS-EM-VR-125	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Emilio Moro	Valderramiro	2014
NS-O-1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Ossian	KPK1	2013
NS-O-23	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Ossian	L20	2013
NS-O-120	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Ossian	Navales	2013
NS-O-57	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Ossian	QL1	2013
NS-O-157	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Ossian	QL1	2014
NS-PDC-1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Pago de Carraovejas	PDC6 baja	2013
NS-PDC-10	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Pago de Carraovejas	PDC6 baja	2013
NS-PDC-13	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Pago de Carraovejas	PDC6 baja	2013
NS-PDC-105	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Pago de Carraovejas	T-2	2013

Cepa	Especie	Bodega	Finca	Año
NS-PDC-100	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Pago de Carraovejas	A-2	2013
NS-PDC-99	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Pago de Carraovejas	A-2	2013
NS-EM-HO-136	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Emilio Moro	Horcajo	2014
NS-EM-MA-67	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Emilio Moro	Moradillo	2013
NS-EM-VR-119	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Emilio Moro	Valderramiro	2014
NS-G-13	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-3	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-32	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-O-46	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Ossian	QL1	2013
NS-PDC-75	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Pago de Carraovejas	A-3	2013
NS-PDC-41	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Pago de Carraovejas	PDC11	2013
NS-PDC-44	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Pago de Carraovejas	PDC11	2013
NS-EM-VR-113	<i>Metschnikowia fructicola</i> (*)	Emilio Moro	Valderramiro	2014
NS-O-61	<i>Metschnikowia fructicola</i> (*)	Ossian	Alto Camino	2013
NS-O-69	<i>Metschnikowia fructicola</i> (*)	Ossian	Alto Camino	2013
NS-O-29	<i>Metschnikowia fructicola</i> (*)	Ossian	L20	2013
NS-PDC-14	<i>Metschnikowia fructicola</i> (*)	Pago de Carraovejas	PDC6 baja	2013
NS-PDC-191	<i>Metschnikowia fructicola</i> (*)	Pago de Carraovejas	PSD-063	2014
NS-PDC-193	<i>Metschnikowia fructicola</i> (*)	Pago de Carraovejas	PSD-063	2014
NS-PDC-194	<i>Metschnikowia fructicola</i> (*)	Pago de Carraovejas	PSD-063	2014
NS-PDC-195	<i>Metschnikowia fructicola</i> (*)	Pago de Carraovejas	PSD-063	2014
NS-PDC-207	<i>Metschnikowia fructicola</i> (*)	Pago de Carraovejas	PSD-063	2014
NS-EM-VR-111	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (*)	Emilio Moro	Valderramiro	2014
NS-O-88	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (*)	Ossian	Alto Camino	2013
NS-O-221	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (*)	Ossian	Alto Camino	2014
NS-O-223	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (*)	Ossian	Alto Camino	2014
NS-O-235	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (*)	Ossian	Alto Camino	2014
NS-PDC-141	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (*)	Pago de Carraovejas	PSD-036 PSTM2	2014
NS-PDC-143	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (*)	Pago de Carraovejas	PSD-036 PSTM2	2014
NS-PDC-147	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (*)	Pago de Carraovejas	PSD-036 PSTM2	2014
NS-PDC-149	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (*)	Pago de Carraovejas	PSD-036 PSTM2	2014
NS-PDC-150	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (*)	Pago de Carraovejas	PSD-036 PSTM2	2014
NS-O-32	<i>Metschnikowia viticola</i>	Ossian	L20	2013
NS-O-35	<i>Metschnikowia viticola</i>	Ossian	L20	2013
NS-O-100	<i>Metschnikowia viticola</i>	Ossian	Navales	2013
NS-O-110	<i>Metschnikowia viticola</i>	Ossian	Navales	2013
NS-O-111	<i>Metschnikowia viticola</i>	Ossian	Navales	2013

Cepa	Especie	Bodega	Finca	Año
NS-O-118	<i>Metschnikowia viticola</i>	Ossian	Navales	2013
NS-O-97	<i>Metschnikowia viticola</i>	Ossian	Navales	2013
NS-O-45	<i>Metschnikowia viticola</i>	Ossian	QL1	2013
NS-G-57	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-61	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-70	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-31	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-42	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-44	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-50	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-52	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-54	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-55	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-27	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-46	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-62	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-66	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-71	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-72	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-9	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-PDC-169	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Pago de Carraovejas	PSD-029 PDC9 II	2014
NS-G-34	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-O-11	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Ossian	KPK1	2013
NS-O-14	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Ossian	KPK1	2013
NS-PDC-167	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Pago de Carraovejas	PSD-029 PDC9 II	2014
NS-PDC-171	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Pago de Carraovejas	PSD-029 PDC9 II	2014
NS-G-58	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012
NS-G-63	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Gordonzello	Gordonzello	2012

Dentro de las cepas de no-*Saccharomyces* se ha realizado un estudio para la diferenciación a nivel de especie de dos especies del género *Metschnikowia* (ver apartado 4.2.4.), concretamente *M. pulcherrima* y *M. fructicola*, por su difícil diferenciación taxonómica por las técnicas clásicas y moleculares. Para ello se seleccionan 10 cepas de *M.*

*fructicola* y 10 cepas de *M. pulcherrima*. En la tabla 6 se marcan con un asterisco (\*) las cepas seleccionadas para este estudio. Además de las cepas autóctonas referidas anteriormente, se emplearon las cepas *M. fructicola* CBS8853 y *M. pulcherrima* CECT11202, como cepas tipo, procedentes de las colecciones de cultivo CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht) y CECT (Colección española de cultivos tipo, Valencia), para hacer un estudio en profundidad de estas dos especies.

### 3.2.2. Mantenimiento

La conservación para tiempos cortos de las levaduras aisladas se realizó en tubos con medio YMA (*Yeast Morphology Agar*) inclinados y almacenados a 4°C.

Para la conservación a largo plazo las levaduras se mantuvieron a -80°C en medio de criopreservación.

## 3.3. Medios de cultivo, tampones, disoluciones, reactivos y cepas tipo

### 3.3.1. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivos preparados se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos y son dispensados posteriormente en placas Petri o tubos eppendorf según sea necesario.

La composición y uso de los medios de cultivo empleados durante el desarrollo experimental se describen a continuación.

#### 3.3.1.1. Medio base YMA (*Yeast Malt Agar*)

Los componentes del medio de cultivo son: Glucosa anhidra (10,0 g), proteosa peptona nº3 (5,0 g), extracto de levadura (3,0 g), extracto de malta (3,0 g), agar (20,0 g) y agua destilada (1000 mL).

Uso: Tras la esterilización, el medio fue dispensado en placas Petri y utilizado como medio de mantenimiento de las levaduras estudiadas.

#### **3.3.1.2. Agar Sabouraud-Cloranfenicol-Rosa de Bengala**

Es un medio comercial, PANREAC QUIMICA SAU (adicionando rosa de bengala y cloranfenicol). Sus componentes son: Glucosa anhidra (40,0 g), mezcla de Peptonas (10,0 g), cloranfenicol (0,05 g), rosa de bengala (0,03 g), agar (15,0 g) y agua destilada (1000 mL).

Uso: Tras la esterilización, el medio fue dispensado en placas Petri y utilizado para aislamiento final de las colonias de levaduras desde las siembras en profundidad del mosto en medio YMA. Cloranfenicol y rosa de bengala se utilizaron para inhibir o limitar el desarrollo de colonias bacterianas y de hongos filamentosos, respectivamente

#### **3.3.1.3. Medio de crioconservación**

Los componentes de este medio de cultivo son: Glucosa anhidra (1,0 g), peptona de caseína (15,0 g), proteosa peptona (5,0 g), cloruro sódico (5,0 g), extracto de levadura (2,0 g), citrato sódico (1,0 g), bisulfito sódico (0,1 g) y glicerol (150 mL).

Uso: Tras esterilización, el medio fue dispensado en tubos eppendorf de 2 mL a los que previamente se les añadió 25 esferas perforadas de vidrio (criobolas) por tubo. Estas esferas serán las que, tras la crioconservación, sean extraídas una a una para la recuperación de la levadura que se encuentra adherida a la superficie de las mismas

#### **3.3.1.4. YPD (*Yeast Proteose Peptone Dextrose*)**

Los componentes de este medio son: Glucosa anhidra (20,0 g), extracto de levadura (10,0 g), proteosa, peptona (20,0 g) y agua destilada (1000 mL).



Uso: Tras su esterilización, el medio fue dispensado en tubos eppendorf de 2 mL, añadiendo 1 mL por tubo. Este medio se usó para el cultivo de las levaduras, previo a la extracción de su ADN.

#### 3.3.1.5. Medio de lisina

Es un medio comercial, de la casa OXOID. Para su preparación se siguen las instrucciones del proveedor: Se añaden 6.6g en 100 mL de agua destilada que contenga 1 ml de lactato potásico al 50%. Se lleva a ebullición hasta disolución completa agitando frecuentemente para evitar sobrecalentamiento. Se enfría a 50°C y se añade ácido láctico al 10% y se ajusta el pH a 4,5.

Uso: Para el aislamiento de levaduras no-*Saccharomyces* se utilizó el medio de lisina, ya que *S. cerevisiae* no es capaz de crecer en este medio al no ser capaz de usar la lisina como única fuente de nitrógeno.

#### 3.3.2. Tampones, disoluciones, reactivos y cepas tipo

Todos los reactivos químicos utilizados en el presente trabajo fueron de pureza analítica o superior y pertenecen a las casas comerciales de reconocido prestigio como Bio-Rad, Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Macrogen®, Difco, Eppendorf, Fluka, Merck, Panreac, Sigma-Aldrich y Supelco.

Los tampones preparados se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos. A continuación, se describen los tampones, reactivos y disoluciones utilizados indicando los procesos en los que se emplean, concentraciones en caso necesario, composición y conservación.

- Tampón 1 (sorbitol 0,9 M, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 0,1 M. pH 8). Conservar a 4°C.
- Tampón 2 (Tris HCl 50 mM, EDTA 20 mM. pH 8). Conservar a Tª ambiente.
- Liticasa. Conservar a -20°C.



- Disolución Lítica en Tampón 1: 20 mg/mL. Conservar a -20°C.
- Disolución SDS al 10%. Conservar a Tª ambiente.
- Disolución acetato potásico 5M. Conservar a 4°C.
- Disolución de EtOH al 70%. Conservar a -20°C.
- Isopropanol. Conservar a -20°C.

Uso: procedimiento de extracción de ADN: (ver apartados 3.4.1.1.1 y 3.4.1.2.1).

- Tampón TAE 50x (Tris, Acetato, EDTA): Se preparó a una concentración 50x y se diluyó hasta una concentración 1x para su uso. El tampón preparado se esterilizó. Sus componentes son: Tris base (242,0 g), ácido acético glacial (57,1 mL), EDTA (0,5M, pH 8) (100 mL) y añadir agua destilada hasta 1L.
- Tampón de carga 6x: Se preparó a una concentración 6x y se diluyó hasta una concentración 1x para su uso. El tampón preparado se esterilizó. Sus componentes son: TAE 1X, sacarosa (4,0 g), azul de bromofenol (0,25%) (25,0 mg) y agua destilada (10,0 mL).

Uso: electroforesis en gel de agarosa: (ver apartado 3.4.1.1.3).

- Taq polimerasa (ReadyMix™ Taq PCR/Mezcla de reacción con MgCl<sub>2</sub> de Sigma-Aldrich).
- Oligonucleótidos Delta 12 / Delta 21

Delta 1-2	5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3'
Delta 2-1	5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'

- Oligonucleótidos NL1 / NL4

NL 1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
NL 4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

Uso: procedimiento de PCR: (ver apartado 3.4.1.1.2 y 3.4.1.2.2).

- 2-propanol
- Agua calidad LCMS

- Etanol (EtOH)
- Hexano (Hx)
- Ácido fórmico (AcF)
- Disolución AcF 70%. Conservar a Tª ambiente.
- Acetonitrilo (ACN)
- Ácido trifluoroacético (TFA)

Uso: procedimiento de preparación de muestra para análisis por MALDI-TOF MS (ver apartado 3.4.2.2).

- Calibrante Bacterial Test Standard (BTS, Bruker). Este calibrante está constituido por un extracto de la cepa *Escherichia coli* DH5 alpha, que contiene las proteínas ribosomales que figuran en la tabla 7.
- Disolución de matriz HCCA en OS al 50% ACN 2,5% TFA: 10 mg/mL.
- Disolución de matriz HCCA en OS al 75% ACN 2,5% TFA: 10 mg/mL.
- Disolución OS: 75% ACN 2,5% TFA.
- Disolución OS: 50% ACN 2,5% TFA.
- Matriz HCCA
- Matriz 2,5-DHB
- Matriz 1,8,9-Anthracenetriol (DITRANOL).
- Matriz SA
- Matriz 3-HPA
- Ácido trifluoroacético (TFA)

Uso: procedimiento preparación de placa MALDI para análisis por MALDI-TOF MS: (ver apartado 3.4.2.3)

- Cepa tipo *M. fructicola* CBS8853, adquirida de la colección de cultivo CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht).
- Cepa tipo *M. pulcherrima* CECT11202, adquirida de la colección de cultivo CECT (Colección española de cultivos tipo, VALENCIA).

Uso: procedimiento de preparación de muestra para análisis por MALDI-TOF MS (ver apartado 3.4.2.2).

### 3.3.3. Equipos y material auxiliar utilizado

Para llevar a cabo este trabajo se han utilizado los siguientes equipos y material auxiliar:

- Espectrómetro de Masas MALDI-TOF modelo Ultraflex II LIFT de la casa comercial BRUKER.
- Agitador vortex Stuart modelo, SA8.
- Autoclave vertical automático, modelo STERILCLAV-75L RAYPA.
- Balanza analítica Mettler Toledo, modelo AX105 DR, con sensibilidad de 0.00001 g, calibrada por laboratorio acreditado por ENAC.
- Baño de ultrasonidos P-Selecta.
- Centrífugas:
  - Modelo SIGMA 3K30, velocidad máxima 30.000 rpm.
  - Modelo Eppendorf AG, modelo 5415 R, velocidad máxima 13200 rpm.
  - Modelo Combi-spin FVL-2400 plus, Boeco.
- Campana extractora Flores Valles.
- Campana de flujo laminar TELSTAR Industrial S.L., modelo PV-100.
- Congeladores:
  - Premium No Frost, LIEBHERR.
  - Ultracongelador -80°C Heraeus Hera freeze .
- Equipo de electroforesis:
  - Cubeta BIO-RAD Mini-Sub® Cell GT Cell.
  - Fuente de alimentación BioRad PowerPac Mini Power Supply.
- Estufa incubadora IDL, INDELAB.
- Incubadora Labnet, modelo D1200-230V.
- LIEBHERR MedLine LKv 3913 Index .
- Microondas Wistercool.

- Micropipetas:
  - Monocanal Eppendorf (2, 20, 100, 200 y 1000  $\mu\text{L}$ )
  - Repetitiva Eppendorf (1000  $\mu\text{L}$ ).
- Microscopio digital, modelo Dino-Lite AM 211, aumento 200x
- Nanodrop THERMO, modelo 2000c.
- pH-metro (Cryson pH-metro de sobremesa BASIC 20).
- Placa MALDI Anchorchip.
- Placa MALDI 384 massive.
- Sistema de revelado de geles de agarosa.
- Termociclador para PCR Eppendorf AG, modelo Mastercycle.
- Transiluminador VILBER LOURMAT.

### 3.3.4. Librería de espectros de masas MALDI-TOF MS

Se ha utilizado una librería creada en colaboración con la profesora M<sup>a</sup> Ángeles Gómez Flechoso del departamento de matemática aplicada, de la facultad de ciencias biológicas y el profesor Nicolás Cardiel López del departamento de Física de la Tierra, Astronomía y Astrofísica II, de la facultad de ciencias físicas de la UCM. Los programas matemáticos empleados para generar la librería han sido principalmente:

- Programa estadístico en lenguaje de programación R, con el uso del paquete MassSpecWavelet.
- Programa en lenguaje FORTRAN, desarrollado para el análisis de líneas espectrales.

### 3.4. Procedimientos

#### 3.4.1. Técnicas biológicas

##### 3.4.1.1. Identificación molecular intraespecífica de levaduras en *S. cerevisiae*: estudio de polimorfismos de las regiones interdelta.

###### 3.4.1.1.1. Extracción del ADN

En 1 mL de medio YPD (contenido en tubo eppendorf de 2mL) se cultivan las levaduras aisladas de mostos en fermentación, durante 4 horas a 28°C. A continuación, se centrifuga el cultivo durante 3 minutos a 12.000 rpm a Tª ambiente. Se desecha el sobrenadante y se añade sobre el pellet 1 mL de agua destilada. Se centrifuga durante 3 minutos a 10.000 rpm, se desecha el sobrenadante y se añade de nuevo 1 mL de agua destilada, seguido de centrifugación en las mismas condiciones, con el objetivo de lavar bien las células. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 500 µL de Tampón 1. A continuación, se añaden 30 µL de disolución Liticasa, se agita brevemente en el vortex y se incuba durante 3 horas a 28°C.

Finalizada la incubación, se centrifuga durante 3 minutos a 7.000 rpm, se elimina el sobrenadante y con ayuda de la micropipeta repetitiva, se resuspende el pellet en 500 µL de Tampón 2. Se añaden 13 µL de SDS 10% y se agita en vortex; se incuba durante 10 min en agitación a 65°C. A partir de este momento, hay que tener la precaución de trabajar siempre a 4°C en baño de hielo.

En el siguiente paso, se añaden 200 µL de acetato potásico 5M (previamente enfriado a 4°C) y se agita por inversión. La mezcla resultante se incuba en hielo 10 minutos y se centrifuga durante 15 minutos a 13.200 rpm a 4°C. Se transfiere el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se repite la centrifugación en las mismas condiciones. Finalizada la segunda centrifugación, el sobrenadante se transfiere a un tubo eppendorf con 700 µL de isopropanol (previamente enfriado a -20 °C) y se agita suavemente por inversión. Se mantiene durante 20 minutos a -20 °C y seguidamente, se centrifuga durante 10 minutos a

12.000 rpm a 4°C. Se desecha el sobrenadante, se añaden sobre el pellet 500 µl de EtOH al 70% y se centrifuga durante 5 minutos a 12.000 rpm a 4°C. Se repite el último lavado con EtOH volviendo a centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm a 4°C. Después de la segunda centrifugación se elimina el máximo EtOH posible del sobrenadante con una micropipeta y el resto se elimina por evaporación dejándolo secar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet seco se resuspende en 30 µl de agua destilada y se mantiene a 4°C durante 12-16h para hidratar el ADN. Posteriormente, si no se va a analizar de forma inmediata, se conserva en congelador a -20°C hasta su uso.

El ADN así extraído se analiza en cuanto a su pureza y concentración realizando una medida espectrofotométrica a dos longitudes de onda (280nm y 260nm). La valoración se realiza en un espectrofotómetro NanoDrop 1.000 (Thermo-Fischer). El ADN valorado se diluyó de forma apropiada con agua para su utilización en las reacciones de PCR.

#### **3.4.1.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se realiza la PCR utilizando una micropipeta repetitiva (con las puntas recomendadas por el fabricante) y preparando las mezclas de reacción de PCR en placas de 96 pocillos o si el número de muestras es menor en tubos eppendorf de 0,2 mL. El método seguido para la diferenciación de cepas de levadura dentro de la especie *Saccharomyces*, consiste en una reacción de PCR que utiliza los oligonucleótidos cebadores Delta 12 y Delta 21 para amplificar la región del ADN comprendida entre ambos cebadores u oligonucleótidos (región interdelta).

Oligonucleótidos:	Delta 12	5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3'
	Delta 21	5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'

La mezcla de reacción de PCR contiene: 25 µl de Taq polimerasa (ReadyMix™ Taq PCR/Mezcla de reacción con MgCl<sub>2</sub> de Sigma-Aldrich), 2 µl de cada oligonucleótido cebador (del stock preparado a 50 µM) y 19 µl de agua destilada Milli-Q. Se obtiene un volumen final

de mezcla de reacción de 48 µl a los que se añade 2 µl de la muestra de ADN extraída (a una concentración de 100 ng/µl).

El programa de amplificación seguido por el termociclador, Eppendorf Mastercycler 5333, fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos de PCR (desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación de cebadores a 46°C durante 30 segundos y una elongación a 72°C durante 90 segundos), con una fase de elongación final a 72°C durante 10 minutos, seguida de la fase de refrigeración a 10°C durante el tiempo que sea necesario para recoger los productos de la PCR.

#### **3.4.1.1.3. Electroforesis en geles de agarosa**

Para la comprobación de la eficacia de PCR, los productos amplificados por PCR, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 6% en tampón TAE 1x. Se preparan los geles y una vez que la agarosa está fundida y atemperada se añade GelRed® (10000X, Biotium) en una proporción de 2 µl de GelRed® cada 30 mL de agarosa. Se vierte la agarosa fundida sobre la bandeja de electroforesis, se coloca el peine y se deja gelificar. Una vez solidificado el gel, se mezclan 50 µl del producto amplificado en la PCR con 4 µl de tampón de carga. Se introduce la muestra en el pocillo correspondiente, se coloca la tapa de la cubeta de electroforesis y se conecta la fuente de corriente. Los geles se dejan correr durante 2 horas a 80V. Como referencia visual se deja que discurra la electroforesis hasta que el frente delimitado por el azul de bromofenol llega a 1 cm del borde. El gel de electroforesis se lleva a un transiluminador UV para la observación de las bandas de ADN amplificadas por PCR.

#### **3.4.1.2. Identificación molecular de levaduras a nivel de especie: Secuenciación de la región D1/D2**

##### **3.4.1.2.1. Extracción del ADN**

Se realiza la extracción del ADN de las levaduras tal y como se describe en el apartado 3.4.1.1.1.

#### 3.4.1.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realiza una PCR utilizando la micropipeta repetitiva (con las puntas recomendadas por el fabricante) y preparando las mezclas de PCR en placas de 96 pocillos.

El método seguido para la diferenciación de especies de levadura se realizó según lo descrito por Kurtzman y Robnett (1991). En la PCR, se amplifica la región variable D1/D2 de la subunidad 26S del ADN ribosomal utilizando los oligonucleótidos universales NL-1(forward) y NL-4 (reverse), generando un amplicón de 680 pb.

Oligonucleótidos:      NL 1    5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'  
                                 NL 4    5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

La mezcla de reacción de PCR contiene: 12,5 µl de Taq polimerasa (ReadyMix™ Taq PCR/Mezcla de reacción con MgCl<sub>2</sub> de Sigma-Aldrich), 1 µl de cada oligonucleótido cebador (del stock preparado a 50 µM) y 10,5 µl de agua destilada Milli-Q. Se obtiene un volumen final de mezcla de reacción de 24 µl a los que se añade 1 µl de la muestra de ADN extraída (a una concentración de 100 ng/µl).

El programa de amplificación seguido por el termociclador, Eppendorf Mastercycler 5333, fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de PCR (desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación de cebadores a 56°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos), con una fase de elongación final a 72°C durante 8 minutos, seguida de la fase de refrigeración a 10°C hasta que se recojan los productos de PCR.

#### 3.4.1.2.3. Purificación del producto de PCR

Para la secuenciación (apartado 3.4.1.2.4), los fragmentos D1/D2 generados en la amplificación por PRC del ADN requieren ser purificados. Para ello, se utiliza el kit de purificación UltraClean™ PCR Clean-Up (MOBIO Laboratories), basado en el paso de los productos de PCR a través de columnas de sílice, y se siguen las instrucciones del fabricante.



#### **3.4.1.2.4. Secuenciación de la región de ADN amplificada e identificación**

El ADN producto de la PCR y purificado se analiza en cuanto a su pureza y concentración realizando una medida espectrofotométrica a dos longitudes de onda (280nm y 260nm). La valoración se realiza en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo-Fischer). El ADN valorado se diluyó de forma apropiada (10 ng/100pb) con agua para su utilización en las reacciones de secuenciación.

El producto de PCR purificado se envió a secuenciar a la casa comercial MacroGen® y se secuenció por el método de Sanger (Sanger F, 1977). Las secuencias obtenidas de dicho proceso se analizaron utilizando el software ClustalW disponible gratuitamente en internet. Una vez obtenida la secuencia consenso utilizando la secuencia para ambos sentidos de la secuenciación (forward & reverse), esta se contrastó con la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

En la el apartado 4.1.3.1. del Capítulo 4. Resultados y discusión, en la tabla 8 se indican las cepas de levadura secuenciadas, así como su número de acceso a GenBank.

### **3.4.2. Técnica espectrometría de masas MALDI-TOF MS**

#### **3.4.2.1 Selección de cepas de levadura**

La selección de cepas de levaduras llevada a cabo entre el total de levaduras aisladas durante las vendimias de los años 2011 a 2014 (ver apartado 3.2.1) se realizó de acuerdo a dos criterios. 1) De *S. cerevisiae* se seleccionaron 98 cepas, las cuales presentaban polimorfismos diferentes, de forma que se analizó por MALDI-TOF MS toda la diversidad de cepas encontrada en las tres D.O. analizadas. 2) Para las especies pertenecientes a especies de géneros no-*Saccharomyces* se realizó un análisis por MALDI-TOF MS de todas las especies encontradas en base a su abundancia relativa. Para las especies con menor presencia, se analizaron todos los aislamientos realizados. Para las especies con mayor representación se

analizaron porcentajes comprendidos entre el 5 y el 10% de los aislamientos según su mayor o menor representación, respectivamente.

Las cepas de levadura seleccionadas para el análisis por MALDI-TOF MS de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* se detallan en la tabla 5 (las que aparecen con el signo + en la columna MALDI) y tabla 6 (todas ellas), respectivamente.

### **3.4.2.2. Preparación de muestra**

#### **3.4.2.2.1. Crecimiento de la levadura**

Como continuación del apartado 3.2.2. (mantenimiento de levaduras), las cepas de levaduras que estaban independientemente conservadas y almacenadas en viales criogénicos a -80 °C, se reactivan sacando una criobola de cada cepa, que se transfiere a una placa Petri con medio YMA; cultivándose a 28 °C durante 24-48 h. Posteriormente, se realiza una resiembra en una placa Petri de 5 cm que contiene medio YMA, sembrando la placa en la totalidad de su superficie (siembra en césped), y se cultiva a 28 °C durante 20-24 h.

#### **3.4.2.2.2. Preparación de disoluciones para la extracción de proteínas y otras disoluciones**

Para la extracción de proteínas de la muestra, preparación de la placa MALDI y calibrante BTS se preparan las siguientes disoluciones, indicando su modo de conservación y duración de las mismas:

- - Disolución de AcF al 70%. Se mezclan 700 µL de AcF con 300 µL de agua calidad LCMS; se agita en baño ultrasonidos 5 minutos antes de su uso. Conservar a temperatura ambiente. Caducidad 1 semana.
- - Disolución OS al 75% ACN 2,5% TFA en agua calidad LCMS. Se mezclan 750 µL de ACN, 25 µL de TFA y 225 µL de agua calidad LCMS; se agita en el baño de ultrasonidos 5 minutos y se centrifuga en microcentrífuga antes de su uso. Conservar a 4°C. Caducidad 1 semana.

- - Disolución OS al 50% ACN 2,5% TFA en agua calidad LCMS. Se mezclan 500 µL de ACN, 25 µL de TFA y 475 µL de agua calidad LCMS; se agita en el baño de ultrasonidos 5 minutos y se centrifuga en microcentrífuga antes de su uso. Conservar a 4°C. Caducidad 1 semana.
- - Disolución de matriz HCCA en OS al 75% ACN 2,5% TFA, utilizada para la co-cristalización con las muestras procedentes de cada cepa de levadura. Se prepara una disolución a concentración 10 mg/mL; se pesan 2,5 mg de matriz HCCA y se añaden 250 µL de disolución OS al 75% ACN 2,5% TFA previamente agitada en el baño de ultrasonidos durante 5 minutos y se centrifuga durante 5 minutos. Se agita en vortex 5 minutos y se centrifuga en microcentrífuga antes de su uso. Conservar a 4°C. Caducidad 1 semana.
- - Disolución de matriz HCCA en OS al 50% ACN/2,5% TFA, utilizada para la co-cristalización con el calibrante BTS. Se prepara una disolución a concentración 10mg/mL; se pesan 2,5 mg de matriz HCCA y se añaden 250 µL de disolución OS al 50% ACN/2,5% TFA previamente agitada en el baño de ultrasonidos durante 5 minutos y se centrifuga durante 5 minutos. Se agita en vortex 5 minutos y se centrifuga en microcentrífuga antes de su uso. Conservar a 4°C. Caducidad 1 semana.
- - Disolución de calibrante Bacterial Test Standard (BTS, Bruker). Según recomendaciones del proveedor se añaden 50 µL de Disolución OS al 50% ACN 2,5% TFA al tubo de BTS suministrado por la casa comercial y se pipetea 20 veces para lograr la completa disolución. Se deja reposar cinco minutos a temperatura ambiente y se vuelve a pipetear lentamente 20 veces. Finalmente, el tubo se centrifuga 1 minuto a 13.000 rpm y se separaran alícuotas de 10 µl que se congelan a -20°C.

#### **3.4.2.2.3. Extracción de proteínas**

La levadura cultivada en el medio de cultivo YMA en la placa Petri de 5 cm (apartado 3.4.2.2.1.), se resuspende añadiendo 2 mL de agua sobre la placa, lavando la misma mediante pipeteo repetitivo hasta extraer todo el contenido de levadura. Se traspasan los 2

mL de agua (con levadura) a un tubo eppendorf y se centrifugan a 15.000 rpm durante 4 minutos a 4°C; se descarta el sobrenadante y se añade sobre el sedimento 500 µL de agua, agitando posteriormente en vortex 1 minuto. Se centrifuga a 15.000 rpm durante 4 minutos a 4°C; se descarta el sobrenadante y se añade sobre el sedimento 300 µL de agua, se agita 1 minuto en vortex, se añaden 900 µL de EtOH (inactiva la levadura y precipita el material celular) (Vogel, 2014); se agita 1 minuto en vortex y se centrifuga a 15.000 rpm durante 4 minutos a 4°C; se descarta el sobrenadante y el sedimento se seca al aire durante 1 hora. El tubo eppendorf se introduce al congelador (-20 °C) durante al menos dos días.

En un tubo eppendorf se pesa una cantidad de levadura procesada como se indicó anteriormente, entre 2-3 mg aproximadamente; se añaden 100 µL de AcF (70%), provocando la disrupción de la pared celular, se agita en vortex 1 minuto y se añaden 100 µL de ACN, se agita en vortex 1 minuto y se centrifuga a 15.000 rpm durante 4 minutos a 4°C. El sobrenadante se traspasa a un tubo eppendorf de 200 µL para su análisis por MALDI-TOF MS.

#### **3.4.2.3. Preparación de la placa MALDI Anchorchip**

Previamente a la deposición de la muestra en la placa MALDI, se añaden en cada pocillo de la placa 2 µL de 2-propanol, se deja secar y se añaden 2 µL de Hx, dejando secar nuevamente. A continuación, una alícuota de 2 µL del sobrenadante obtenido de la extracción de proteínas, se transfiere a un pocillo de la placa MALDI Anchorchip de 394 pocillos. Se deja secar completamente al aire y a continuación se deposita sobre la muestra 1 µL de la disolución de matriz HCCA en OS al 75% ACN y se deja secar completamente. Se realizan tres replicas por muestra utilizando tres pocillos contiguos.

Sobre un pocillo situado en centro del cuadrado que forman 8 muestras se añade 1 µL de calibrante BTS. Se deja secar completamente al aire y, a continuación, se deposita sobre el calibrante 1 µL de la disolución de matriz HCCA en OS al 50% ACN y se deja secar completamente. Se utiliza para calibrar las ocho muestras que forman el cuadrado de 8 muestras.

#### **3.4.2.4. Adquisición de espectros de masas**

El análisis de todas las cepas de levadura se ha realizado utilizando el espectrómetro de masas MALDI-TOF modelo UltraFlex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) con láser de nitrógeno a 335 nm y 200-Hz.

El registro de cada espectro de masas fue la suma de 240 disparos de láser de 40 en 40 disparos en diferentes posiciones del pocillo con un voltaje de la fuente de iones I:20 kV y de la fuente de iones II:16,7 kV. En primer lugar, se obtiene el espectro de masas del calibrante BTS, que se usa como calibrante externo, operación que se repite tras el análisis de ocho muestras y que queda grabado automáticamente; a continuación, se registra el espectro de masas de ocho muestras. Esta secuencia se repite para todas los análisis.

El Software FlexControl versión 2.4. (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) se utilizó para el análisis de las muestras, control de los parámetros del método analítico y creación de secuencias de análisis en modo automático.

Los análisis se realizaron de forma automática en modo positivo lineal a una frecuencia de 20 Hz en el margen de masas,  $m/z$ , de 2.000 a 20.000 Da. Para

#### **3.4.2.5. Procesamiento y calibración de los espectros de masas**

El Software FlexAnalysis versión 2.4. (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) se utilizó para la inspección visual, calibración, procesamiento inicial de los espectros de masas, así como para la conversión de los archivos de los espectros de masas a formato ASCII.

Los espectros de masas obtenidos para cada cepa fueron calibrados utilizando el espectro de masas del calibrante externo BTS, obtenido para conjuntos de ocho muestras analizadas de forma seguida, haciendo uso de las masas de referencia, especificadas en la tabla 7, en la que se incluye el límite de tolerancia de las masas. (Bruker, 2012)

Cuando se realiza la calibración externa, se comprueba que todos los iones del calibrante quedan asignados y que la desviación máxima no es superior a  $\pm 300$  ppm para cada una de las masas de referencia.

Una vez calibrado el espectro de masas de cada cepa de levadura, se convierte el archivo en formato ASCII.

Tabla 7. Masas de referencia del BTS

Proteína	Masa de referencia, Da	Margen de tolerancia, Da
RL29 [M+2H] <sup>2+</sup>	3.637,8	3.636,7 – 3.638,8
RS32 [M+H] <sup>+</sup>	5.096,8	5.095,3 – 5.098,3
RS34 [M+H] <sup>+</sup>	5.381,4	5.379,8 – 5.383,0
RS33meth [M+H] <sup>+</sup>	6.255,4	6.253,5 – 6.257,3
RL29 [M+H] <sup>+</sup>	7.274,5	7.272,3 – 7.276,7
RS19 [M+H] <sup>+</sup>	10.300,1	10.297,0 – 10.303,2
RNAsa A [M+H] <sup>+</sup>	13.683,2	13.679,1 – 13.687,3
Mioglobina [M+H] <sup>+</sup>	16.952,3	16.947,2 – 16.957,4

### 3.4.2.6. Creación de librería de espectros de masas

El espectro de masas sintético generado para cada cepa de levadura (ver apartado 3.4.2.6.2.), mediante el empleo del programa desarrollado en lenguaje FORTRAN, se incluye en una carpeta denominada librería de espectros de masas. Esta librería contiene 216 espectros de masas sintéticos de cada una de las cepas de levadura analizadas de los grupos *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*.

#### 3.4.2.6.1. Empleo de un programa estadístico en lenguaje de programación R para la detección de líneas (iones) representativas del espectro de masas.

Los datos de cada espectro de masas en formato ASCII se tratan con un programa estadístico en lenguaje R (R es un lenguaje especialmente diseñado para cálculos estadísticos). A través de este programa se detectan los iones característicos de cada espectro de masas mediante el empleo de un paquete desarrollado para la detección de

líneas representativas en el espectro de masas, utilizando el procedimiento de continuos *wavetel transform* (Pan, 2006); en consecuencia, cada una de las líneas detectadas corresponden a los iones más representativos de cada espectro de masas. Este programa aplica un proceso iterativo que calcula el número de líneas detectadas en el espectro de masas para un determinado valor de la relación señal/ruido (SNR), entre 20 y 5; la SNR va disminuyendo hasta que, bien detecta un número mínimo de 20 líneas o bien llega a una SNR de 5 aunque no se hayan obtenido las 20 líneas requeridas.

Una vez procesados los espectros de masas con las condiciones descritas, se crean automáticamente dos carpetas, “plots-min”, donde se guardan todos los espectros de masas con sus líneas representativas y “líneas-min” donde quedan guardadas las tablas que contienen la información de las líneas más representativas, concretamente las relaciones  $m/z$  y la intensidad de las mismas.

En la figura 6, se muestra a modo de ejemplo el espectro de masas de un calibrante BTS representado mediante el programa estadístico en R. Las líneas detectadas por este programa se muestran en la parte superior e inferior del espectro y los iones representativos que corresponden a esas líneas se marcan mediante círculos en color rojo.

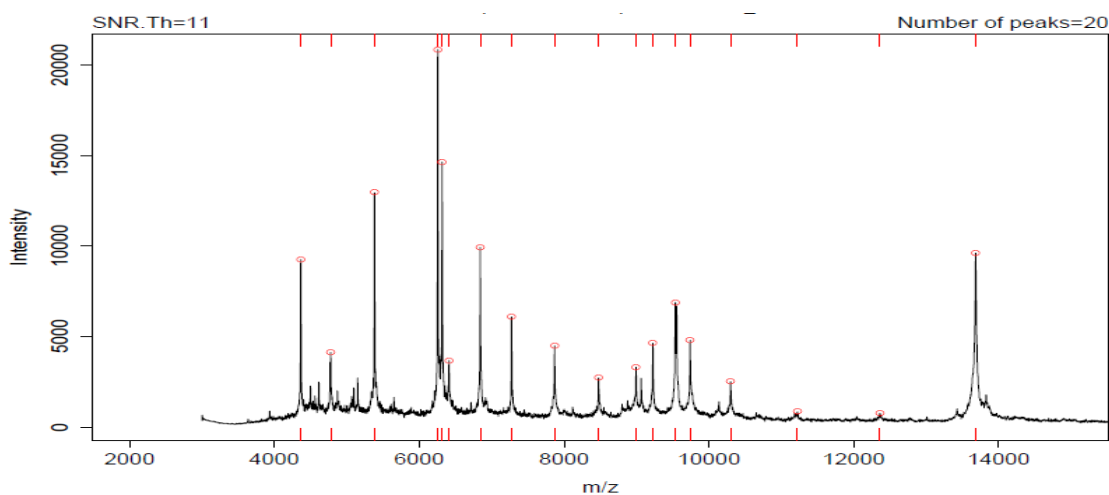


Figura 6. Espectro de masas de calibrante BTS. 20 líneas detectadas a una SNR de 11.

#### **3.4.2.6.2. Empleo de un programa desarrollado en lenguaje FORTRAN para generar espectros de masas sintéticos de cada cepa de levadura**

Con el fin de generar un espectro de masas típico de una cepa de levadura e incluirlo en la librería, se analiza mediante MALDI-TOF MS cada cepa de levadura por triplicado (tres pocillos), obteniendo un espectro de masas por cada pocillo. A continuación mediante el empleo de un programa desarrollado en lenguaje FORTRAN, se obtiene un espectro de masas sintético promedio de cada cepa de levadura. Cada espectro de masas sintético que está presente en la librería se ha obtenido a partir aproximadamente 20 líneas detectadas en un margen de SNR (optimizado previamente) entre 20 y 5.

El término FORTRAN proviene del inglés FORMula TRANslator; es un lenguaje orientado a procedimiento, en el cual el programador al escribir el programa lo hace con una orden determinada para resolver un problema. La ventaja es que con una sola instrucción propia se hace referencia a varias instrucciones a la vez en el lenguaje de la máquina. (<http://larevistainformatica.com/FORTRAN.htm>, 2006)

Este programa cruza las líneas características de cada uno de los tres espectros de masas obtenidas por el procedimiento especificado en el apartado 3.4.2.6.1, buscando las líneas de un espectro de masas en otro permitiendo un error de 10 Da.; a continuación, suma las intensidades de las líneas y genera un espectro de masas promediado, dividiendo en todos los casos la intensidad total de cada línea entre tres, aunque la línea no esté presente en los tres espectros de masas, permitiendo así aportar diferente grado de importancia a la línea en función de su probabilidad de ser observada en el espectro de masas de dicha levadura.

#### **3.4.2.7. Validación de librería**

La validación de la librería se realizó analizando cepas de levadura mediante MALDI-TOF MS e identificándolas con la librería creada, para verificar que el programa estadístico en lenguaje R identifica o no la especie y cepa correctamente. A tal fin se analizaron 10



muestras de cepas de levadura diferentes aplicando el procedimiento especificado en el apartado 3.4.2 de la Parte Experimental, entre los apartados 3.4.2.1 y 3.4.2.8, a 10 muestras (5 del género *Saccharomyces* y 5 de géneros no-*Saccharomyces*) y entre los apartados 3.4.2.2.3 y 3.4.2.6.2. a las mismas muestras pero partiendo de las muestras congeladas. Por otra parte, alícuotas de las mismas muestras procesadas a partir de muestras congeladas, se depositaron en la placa en pocillos alejados analizándose para verificar si la posición en la placa y la distancia al calibrante afecta a la identificación final.

A continuación, se identificaron las cepas analizadas según el procedimiento del apartado 3.4.2.8, obteniéndose el porcentaje de similitud entre la cepa analizada y la presente en la librería.

#### **3.4.2.8. Identificación de muestras de cepa de levaduras**

La comparación del espectro de masas de una cepa de levadura (muestra problema) con los espectros de masas sintéticos de la librería se realiza de forma directa buscando los espectros de masas sintéticos de la librería que contienen las líneas presentes en la muestra problema. De esta forma se obtiene un listado, donde aparece el nombre de cepas en orden de semejanza creciente, considerándose la cepa con mayor porcentaje de similitud, como la más probable.



# Capítulo 4

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Técnicas biológicas

#### 4.1.1. Aislamiento y selección de levaduras

Las muestras objeto de este estudio fueron tomadas durante las vendimias de los años 2011 a 2014 en las bodegas Emilio Moro, Pago de Carraovejas, Gordonzello y Ossian y se procesaron tal como se describe en el Capítulo 3. Parte experimental.

En el aislamiento de cepas de levadura se han diferenciado dos grupos, *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. En el caso de las levaduras del género *Saccharomyces*, especie *S. cerevisiae*, éstas fueron aisladas en la fase de fermentación (años 2011-2012-2013-2014), sembradas en medio Agar Sabouraud-Cloranfenicol y posteriormente en medio YMA; mientras que las cepas de levadura de especies no-*Saccharomyces* fueron aisladas de mosto en etapas previas a la fermentación (años 2012-2013-2014) en medio lisina. Finalmente, tras esta etapa de aislamiento se obtuvo una colección de 1665 cepas de levadura, 880 pertenecientes al género *Saccharomyces* y 785 a géneros no-*Saccharomyces*. Todos ellos fueron diferenciados por la finca y bodega en la que se realizó el aislamiento, excepto los aislamientos de no-*Saccharomyces* de la bodega Gordonzello que fueron obtenidos a partir de mostos resultantes de la mezcla de los mostos procedentes de diversas fincas por cuestiones relacionadas con las prácticas enológicas de la propia bodega en la vendimia de 2012, por lo que no se especifica finca de origen. En las figuras 7 y 8 se visualiza en número de cepas aisladas de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, respectivamente, clasificadas por bodega y año de vendimia en el que se realizó el aislamiento.

En la figura 9, se muestra un ejemplo representativo de una placa Petri donde se observan estrías de crecimiento de una cepa de levadura no-*Saccharomyces* (a), sin embargo no aparecen estrías de crecimiento cuando se siembran cepas de levaduras del género *Saccharomyces* (b, c y d), observándose por lo tanto, diferencias evidentes en su crecimiento diferencial en medio lisina.

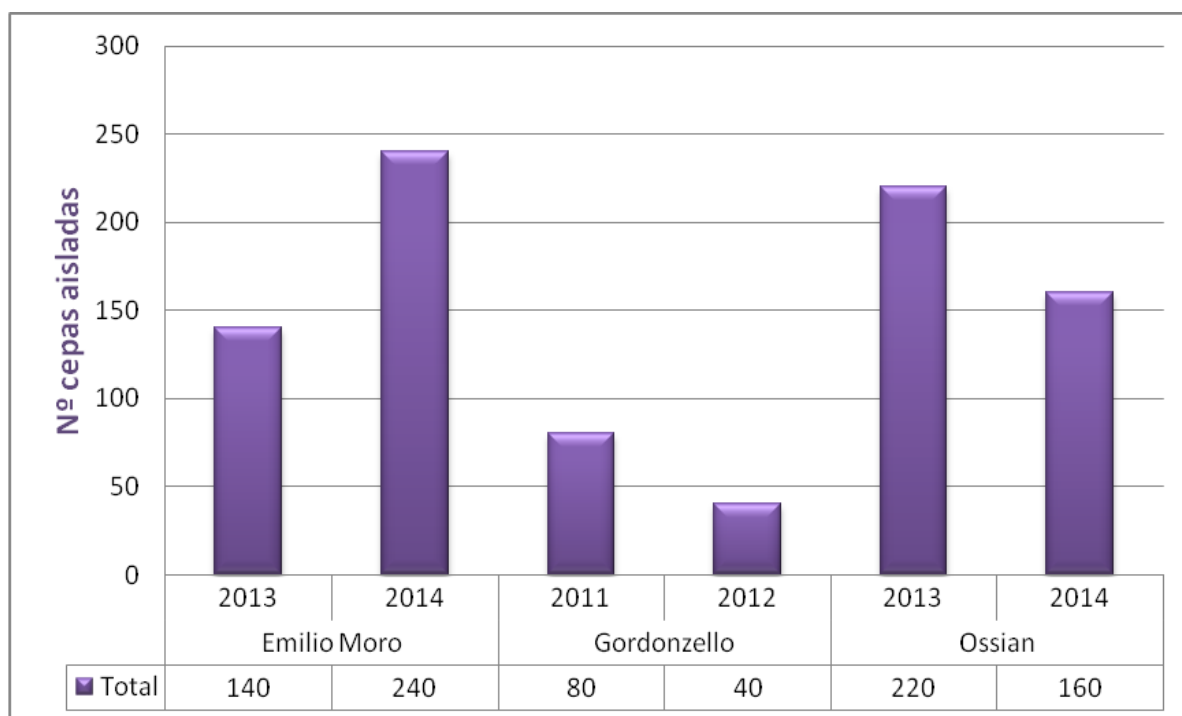


Figura 7. Número de cepas de *S. cerevisiae* aisladas clasificadas por bodega y año.

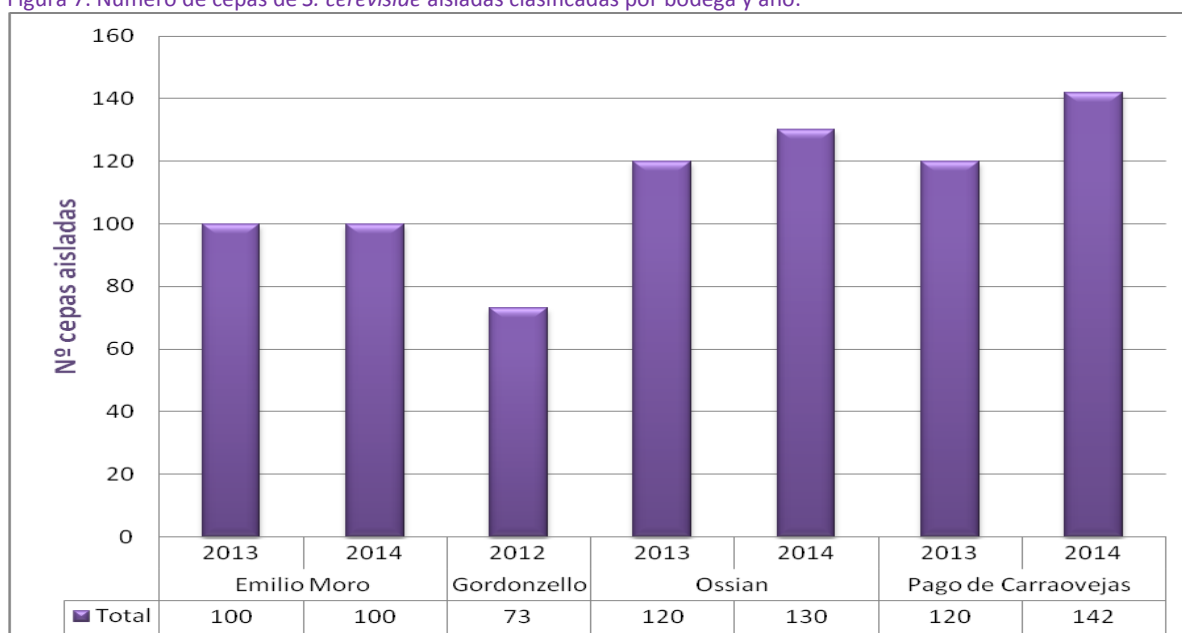


Figura 8. Número de cepas de no-*Saccharomyces* aisladas clasificadas por bodega y año.

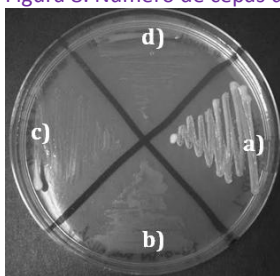


Figura 9. Placa Petri con crecimiento en medio diferencial lisina de no-*Saccharomyces*(a) y *Saccharomyces* (b,c,d).

De acuerdo con Velázquez et al. 2001 la aplicación de las características morfológicas micro y macroscópicas requiere expertos con elevada experiencia para interpretar los resultados debido a que diferentes condiciones de cultivo, como el medio de cultivo y tiempo de incubación, son suficientes para producir diferentes resultados (Velazquez, 2001). En esta tesis, genéricamente, no se han utilizado estas características morfológicas como criterio habitual para distinguir entre los dos grandes grupos de levaduras aisladas, aunque sí se han utilizado de forma secundaria para confirmar las colonias aisladas.

En la selección de levaduras de la especie *S. cerevisiae*, tal y como se especifica en el Capítulo 3. Parte experimental. Apartado 3.2.1.1., de los 880 aislamientos realizados, y tras el análisis genético de los polimorfismos de la región interdelta, se encontraron un total de 224 perfiles polimórficos diferentes y se seleccionó una cepa de cada uno como representante de cada polimorfismo encontrado. A su vez, de los 224 polimorfismos diferentes encontrados se seleccionaron un total de 98 cepas para su análisis mediante MALDI-TOF MS, existiendo entre ellos representantes de todas las bodegas, fincas y años de vendimia (ver en la tabla 4-Capítulo 3. Parte experimental. Apartado 3.2.1.1.- las cepas seleccionadas de *S. cerevisiae*, agrupadas por bodega, finca y año de aislamiento). En la figura 10 se representan el número de cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas por bodega y año de vendimia.

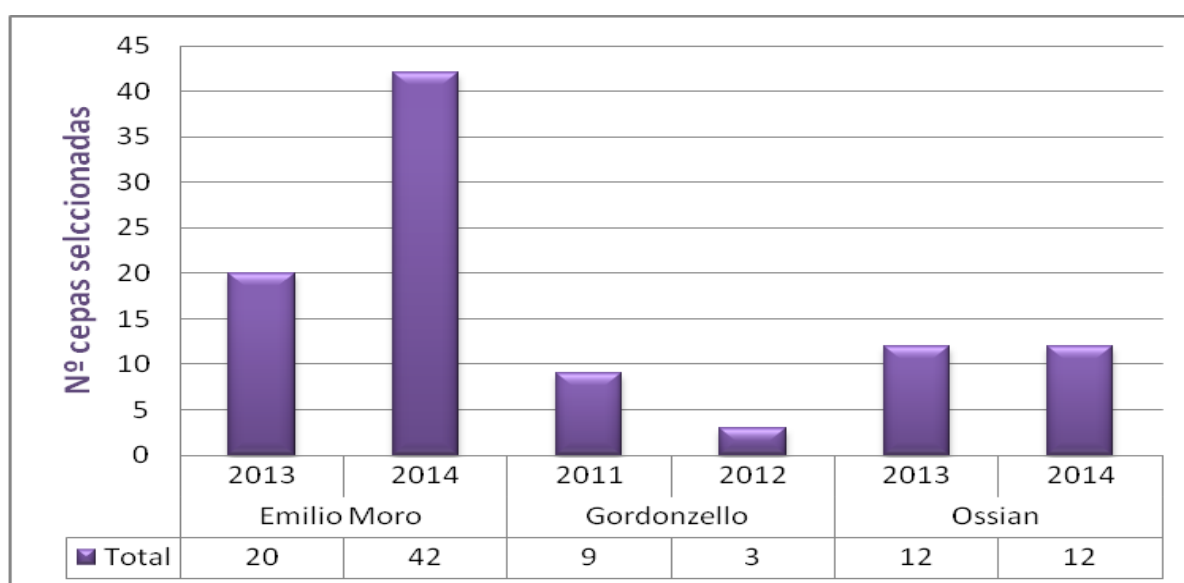


Figura 10. Número de cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas clasificadas por bodega y año

La selección de cepas no-*Saccharomyces*, tal y como se especifica en el Capítulo 3. Parte experimental. Apartado 3.2.1.2, se realizó de forma que existieran representantes de todas las especies aisladas para su análisis mediante MALDI-TOF MS. Se seleccionaron un total de 118 cepas no-*Saccharomyces* que representan entre el 5-10% de los aislamientos para cada especie (ver tabla 5 Capítulo 3. Parte experimental. Apartado 3.2.1.2). En la figura 11 se representa el número de cepas de no-*Saccharomyces* seleccionadas clasificadas por bodega y año y en la figura 12, se muestra el número y nombre de las especies seleccionadas en cada bodega.

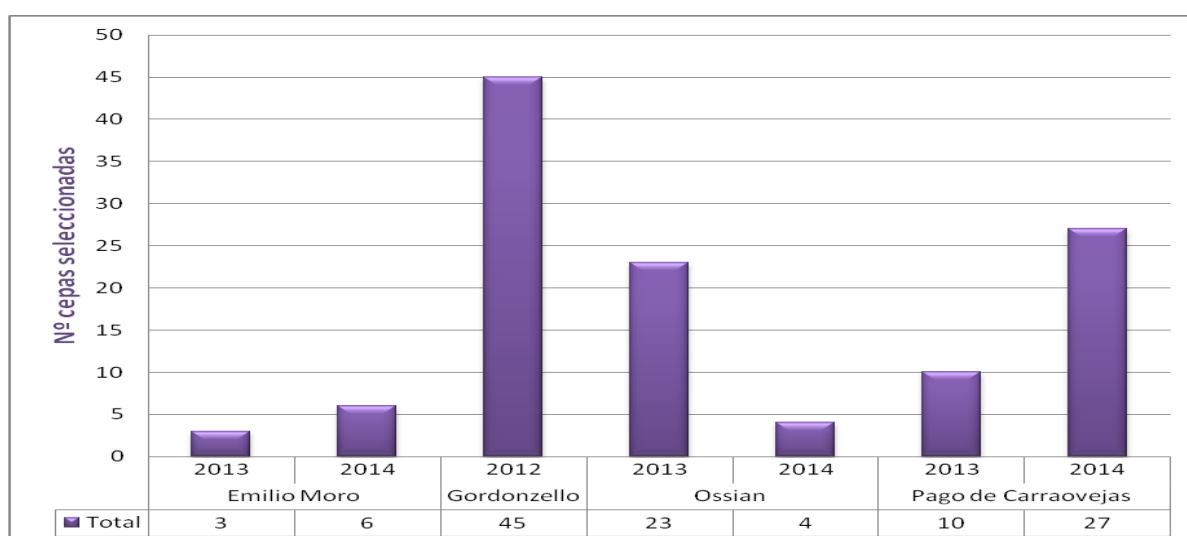


Figura 11. Número de cepas de no-*Saccharomyces* seleccionadas clasificadas por bodega y año

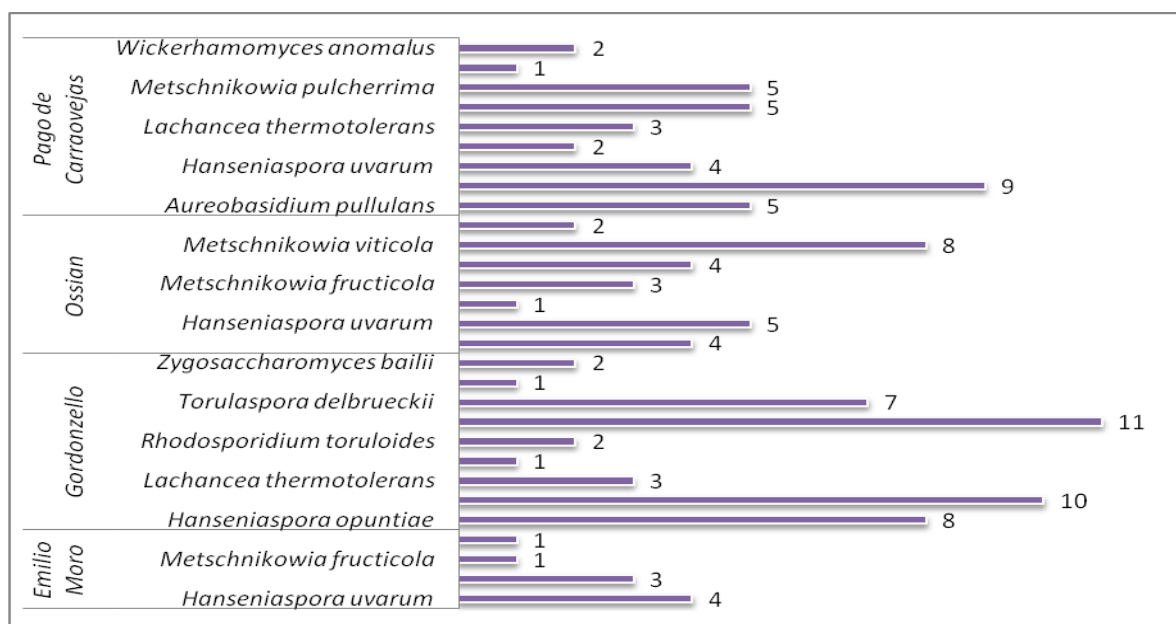


Figura 12. Número de especies seleccionadas pertenecientes a géneros no-*Saccharomyces* clasificados por bodega.



### 4.1.2. Identificación molecular intraespecífica de levaduras en *S. cerevisiae*: estudio de polimorfismos de las regiones interdelta

En los 880 aislamientos de *S. cerevisiae* obtenidos se realizó la extracción de ADN, posterior PCR y electroforesis en gel de agarosa, obteniendo como resultado un patrón de bandas característico (polimorfismo) de cada cepa de *S. cerevisiae* aislada. Se han diferenciado 224 perfiles polimórficos diferentes en toda la variedad de cepas aisladas y se ha seleccionado una cepa de cada uno como representante de cada perfil encontrado. En las figuras 15 a 26 se muestran los patrones de bandas obtenidos por amplificación de la región interdelta de todas las cepas de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en las bodega Emilio Moro, Gordonzello y Ossian, marcando con un recuadro en color rosa las cepas que se han seleccionado para su análisis mediante MALDI-TOF MS y el resto de tipos de polimorfismos encontrados hasta completar los 224 tipos de perfiles polimórficos quedan marcados en color verde.

Todos los polimorfismos encontrados se muestran en la tabla 4 del Capítulo 3. Parte experimental. Apartado 3.2.1.1., quedando clasificado cada tipo de perfil polimórfico con una o dos letras identificativas dentro de cada bodega y finca.

Como se observa en la figura 13 las bodegas analizadas presentan una diversidad de polimorfismos de *S. cerevisiae* muy diferente destacando las Bodegas Emilio Moro por su elevada diversidad, 159 de un total de 224.

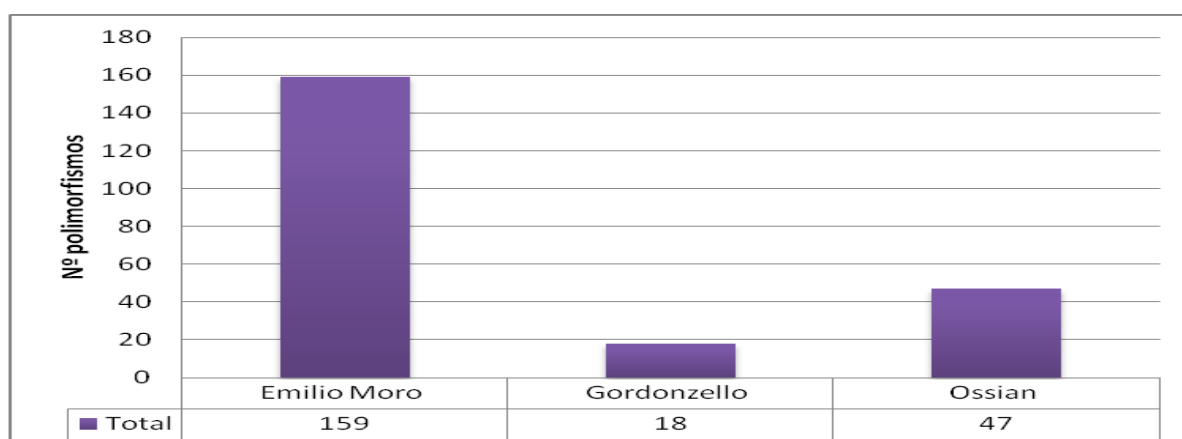


Figura 13. Distribución de polimorfismos de *S. cerevisiae* por bodega

Se ha estudiado los polimorfismos seleccionados en función del año de vendimia y de la bodega o finca en la que han sido encontrados. En la figura 14 se muestra una representación del número de polimorfismos detectados por bodega, año y finca. El mayor número de polimorfismos diferentes aparece en la bodega Emilio Moro, concretamente en la finca Malabrigo. En la bodega Gordonzello es donde existe menos variedad de polimorfismos y en la bodega Ossian, destaca la existencia de un mayor número de polimorfismos principalmente en cuatro de sus fincas.

Diversos autores emplean el estudio de polimorfismos de las regiones interdelta para la diferenciación de levaduras (Combinaa, 2005) (Guillamón, 1998) (Wang, 2013). Sin embargo, estos métodos resultan costosos y se requieren tiempos elevados para su realización, por lo que en los últimos tiempos ha aumentando notablemente la implementación de las nuevas tecnologías (como por ejemplo MALDI-TOF MS) para la identificación rápida y precisa de levaduras.

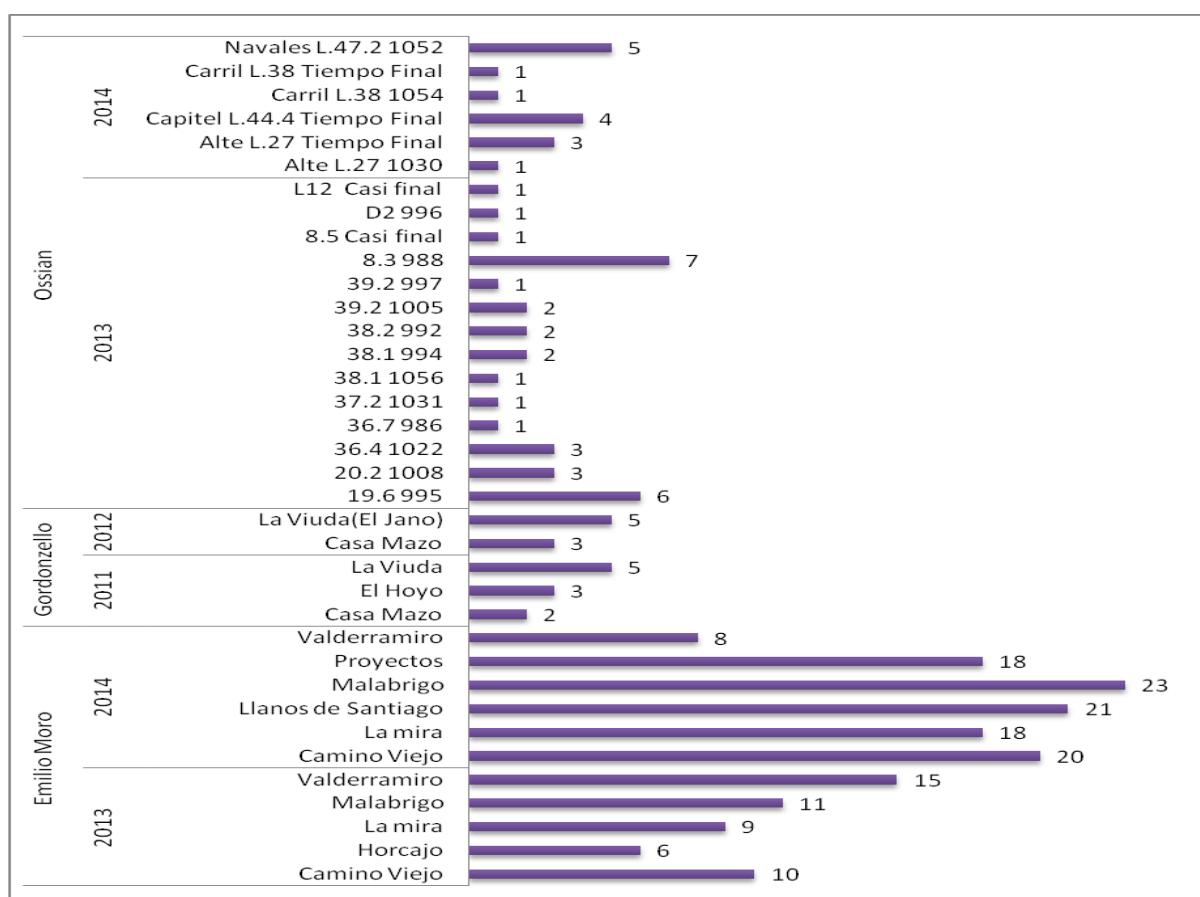


Figura 14. Representación del número de polimorfismos detectados por bodega, año y finca.

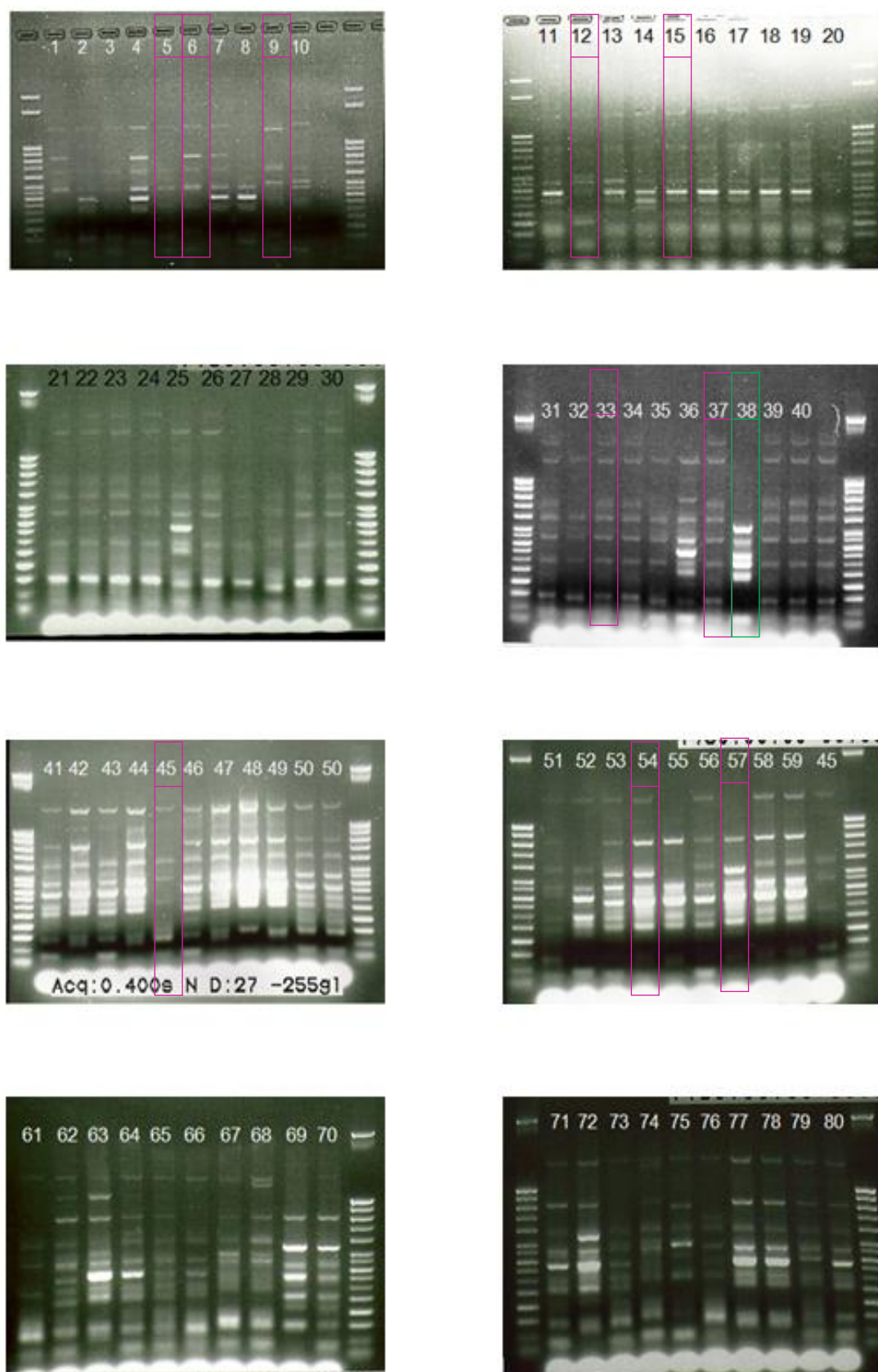


Figura 15. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 1 a la 80 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Gordonzello.

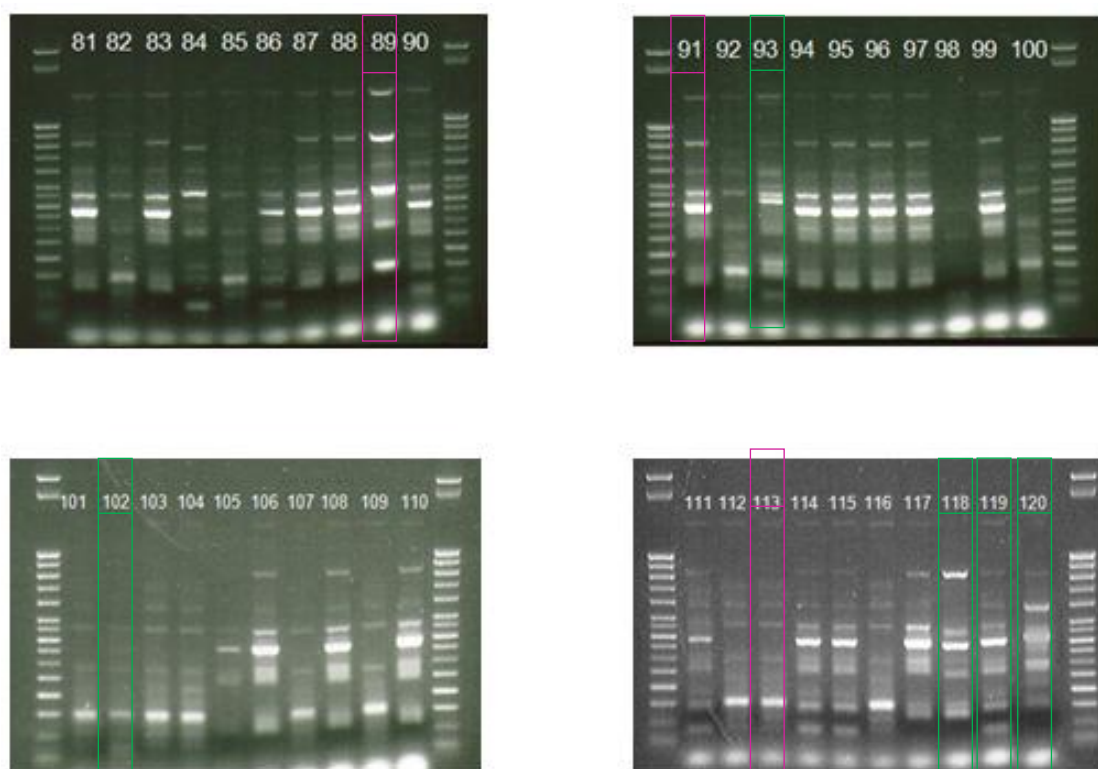


Figura 16. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 81 a la 120 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Gordonzello.

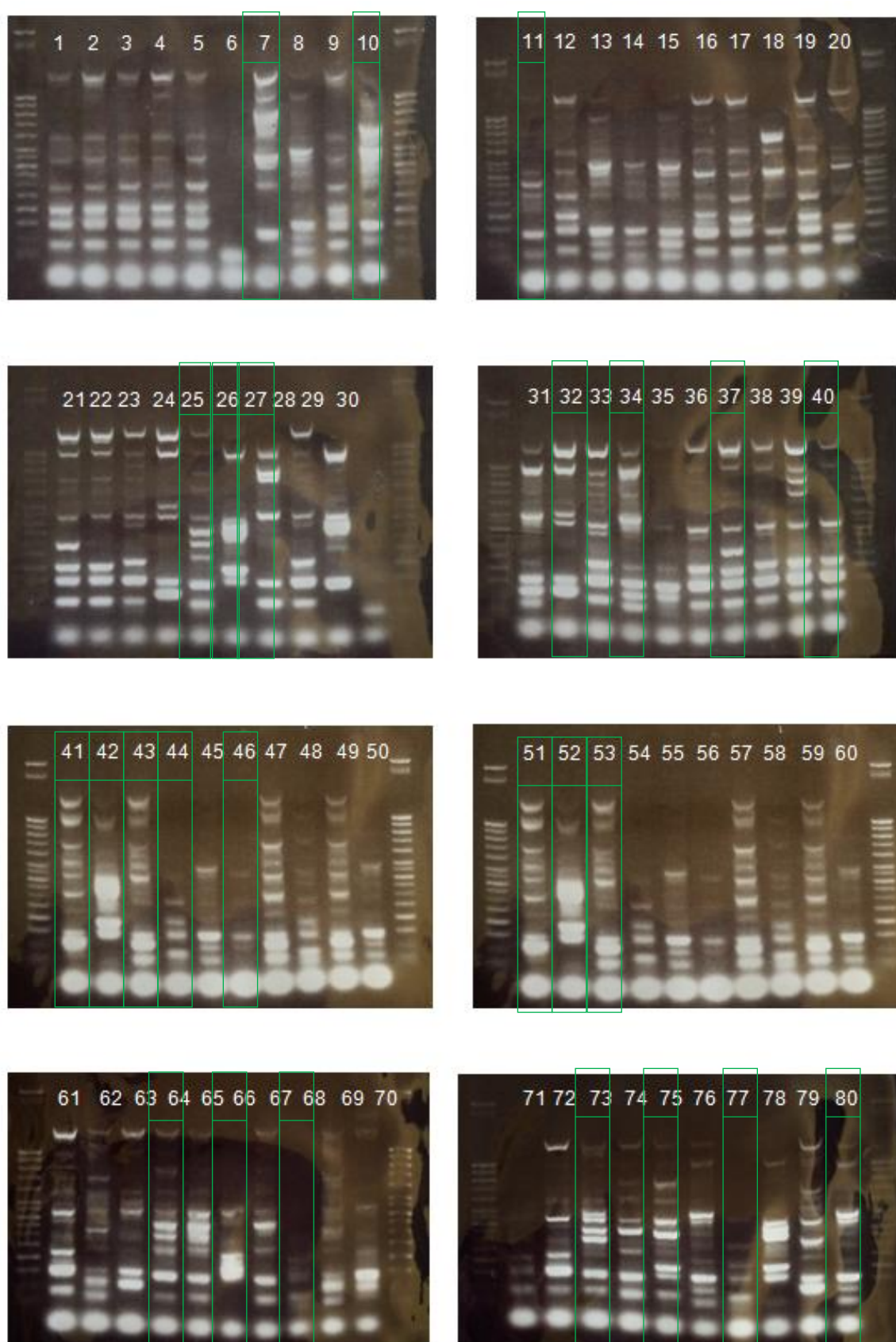


Figura 17. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 1 a la 80 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Emilio Moro.



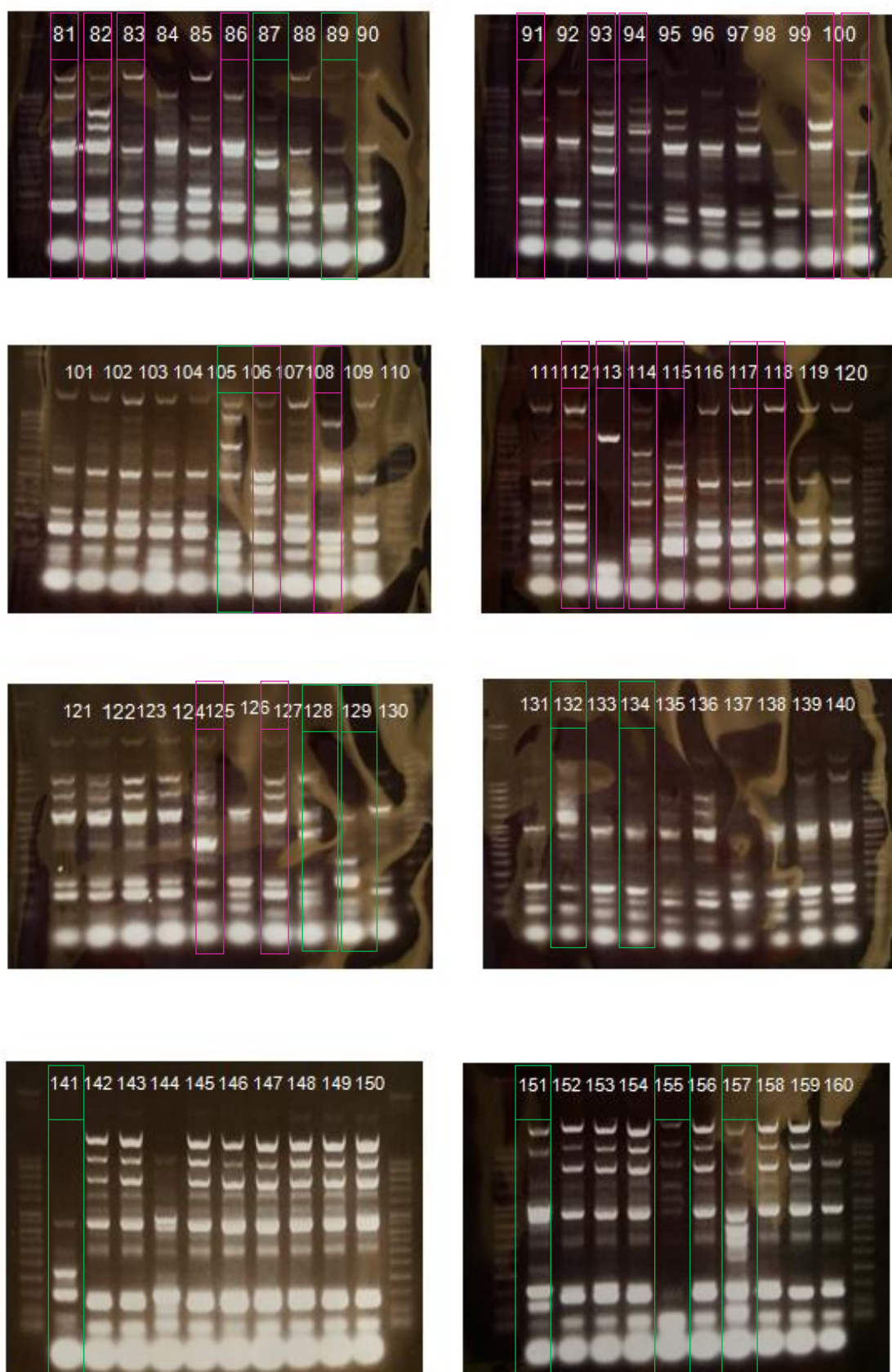


Figura 18. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 81 a la 160 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Emilio Moro.

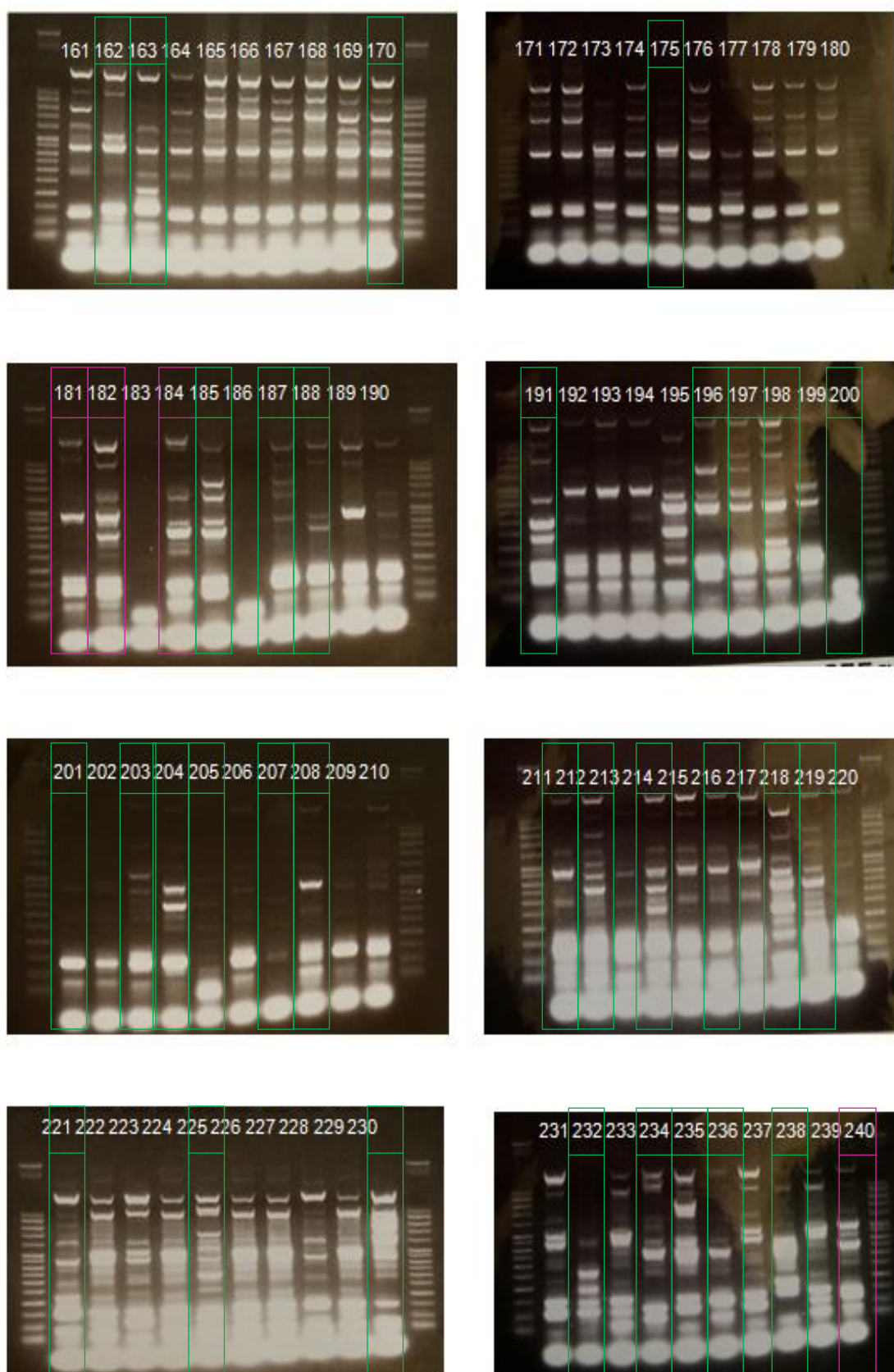


Figura 19. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 161 a la 240 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Emilio Moro.

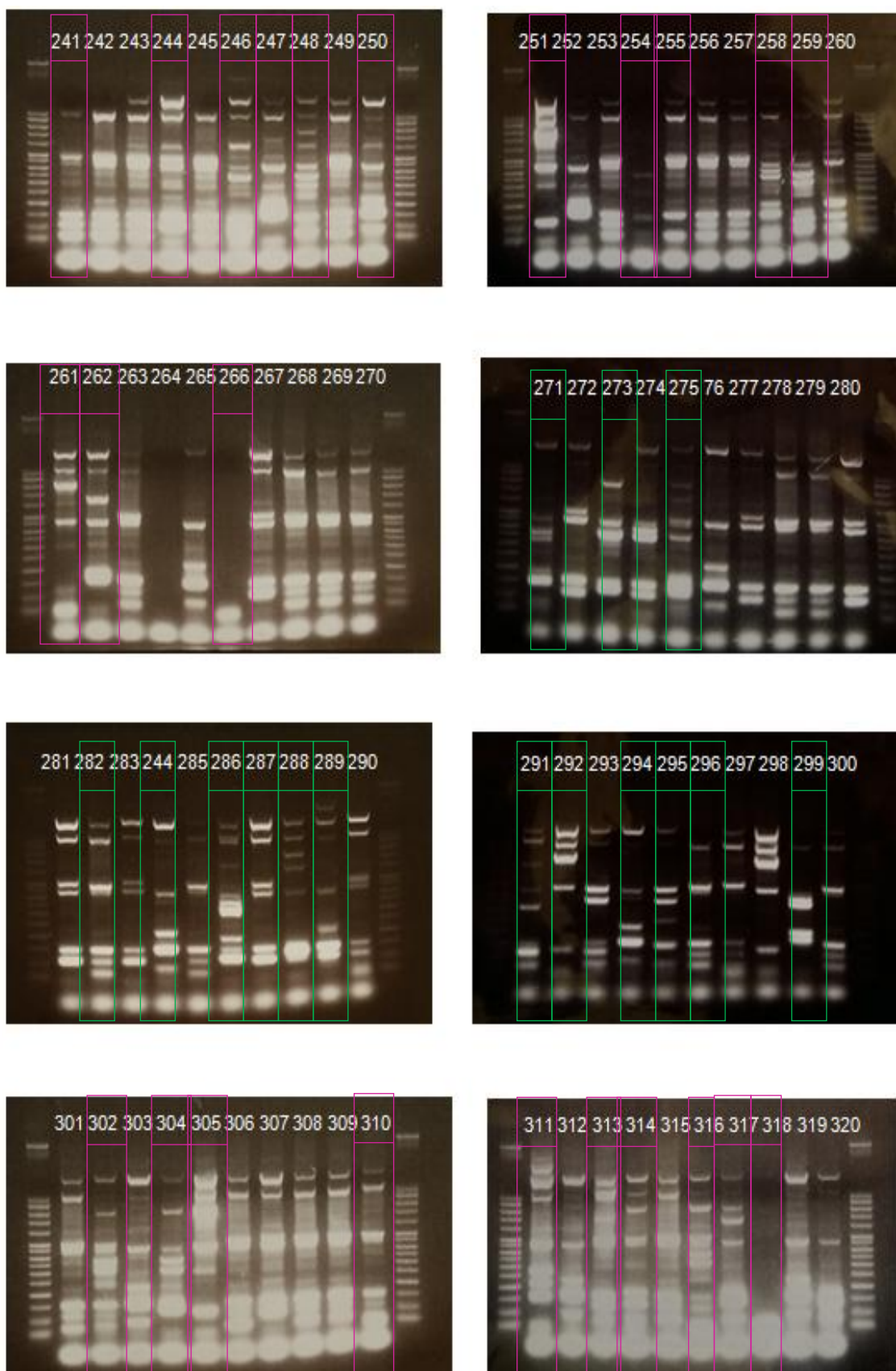


Figura 20. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 241 a la 320 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Emilio Moro.



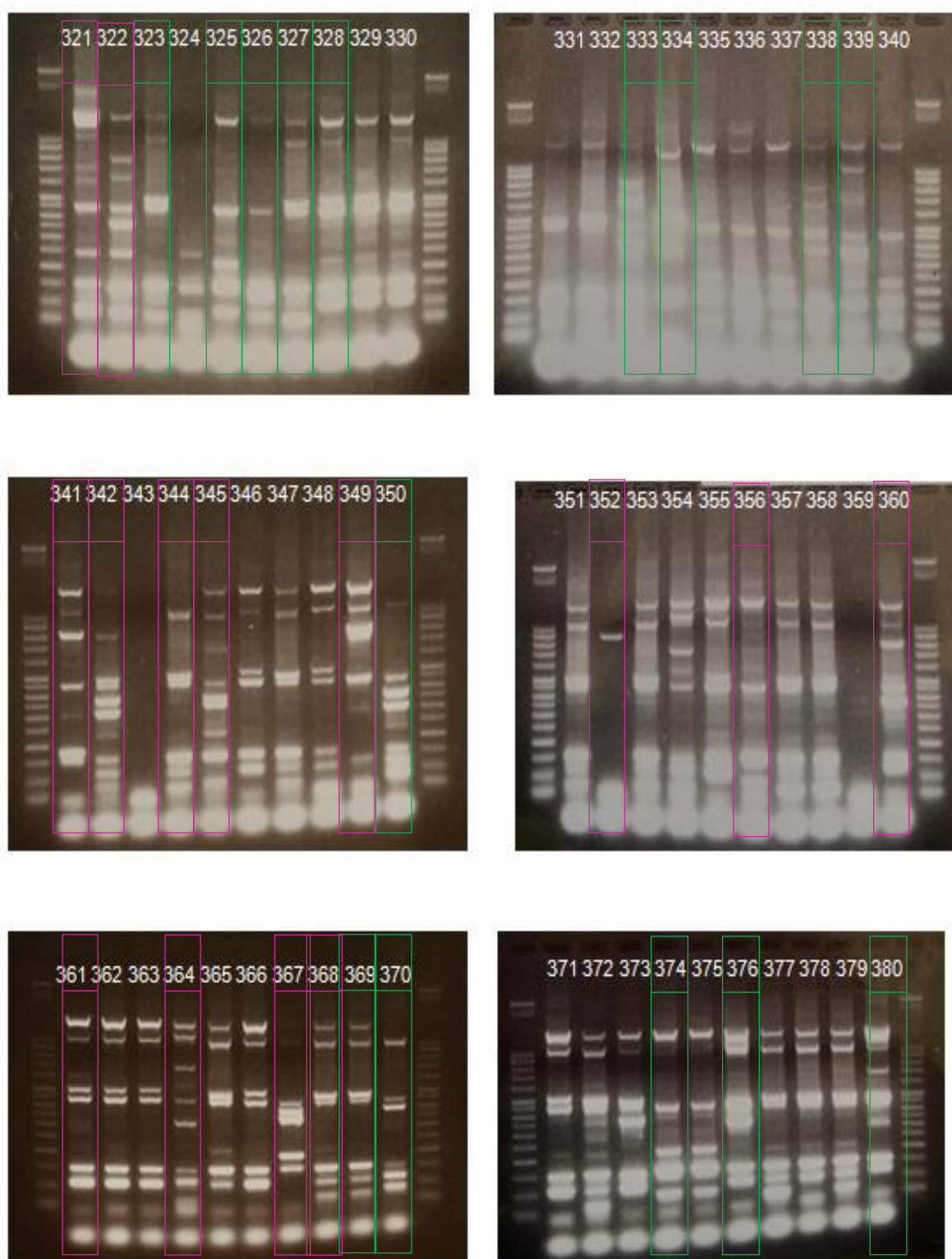


Figura 21. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 321 a la 380 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Emilio Moro.

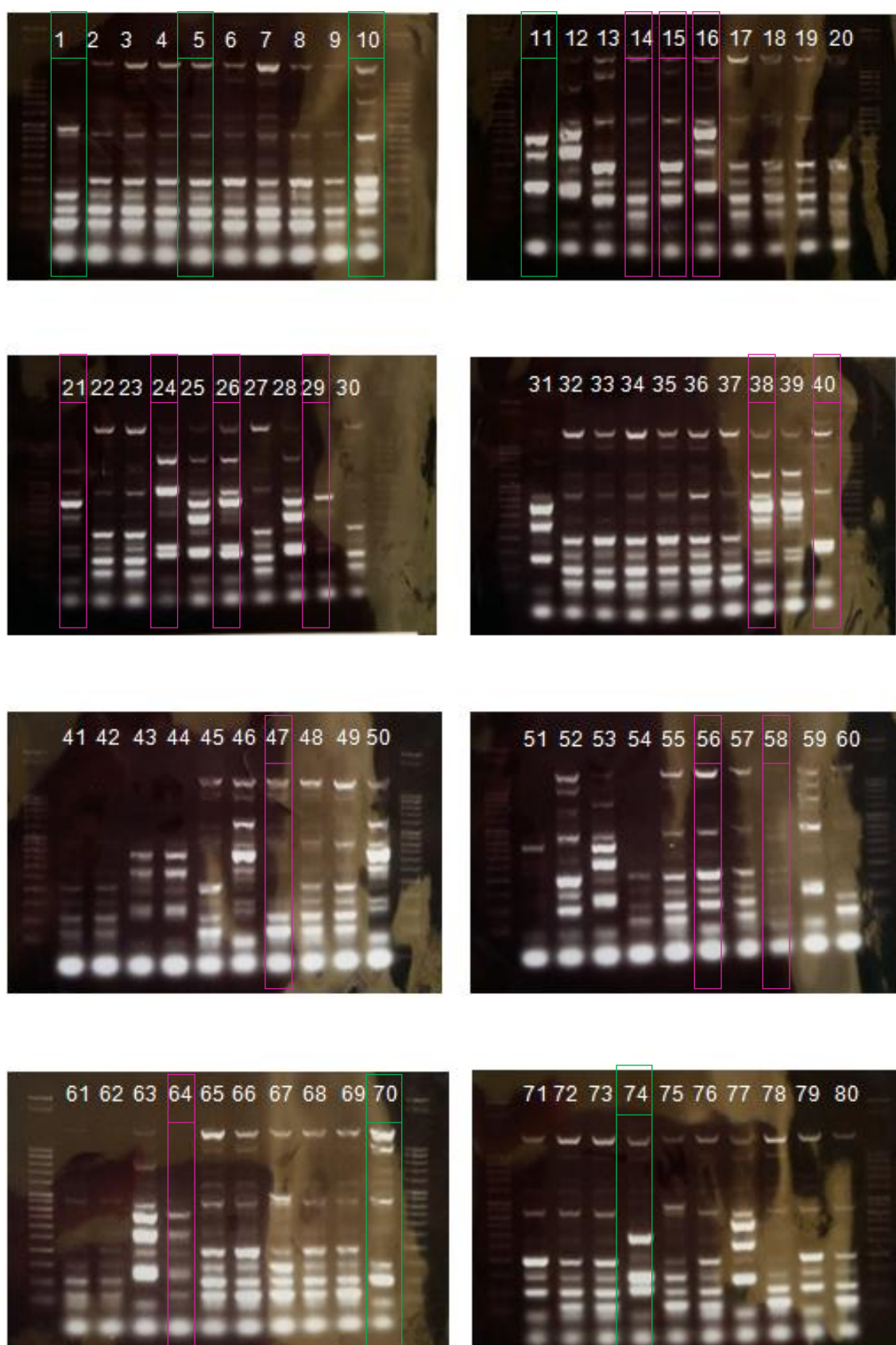


Figura 22. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 1 a la 80 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Ossian.

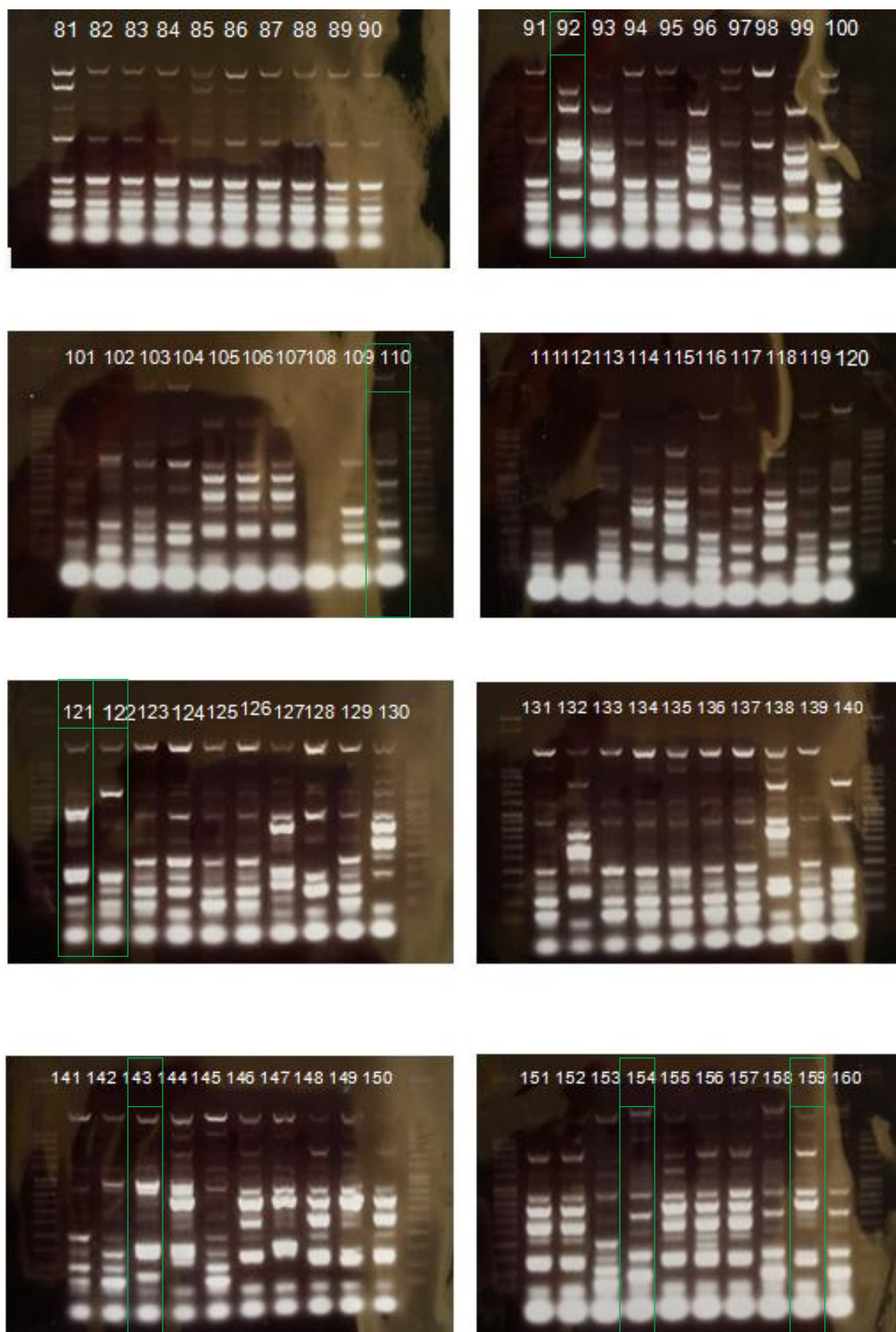


Figura 23. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 81 a la 160 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Ossian.



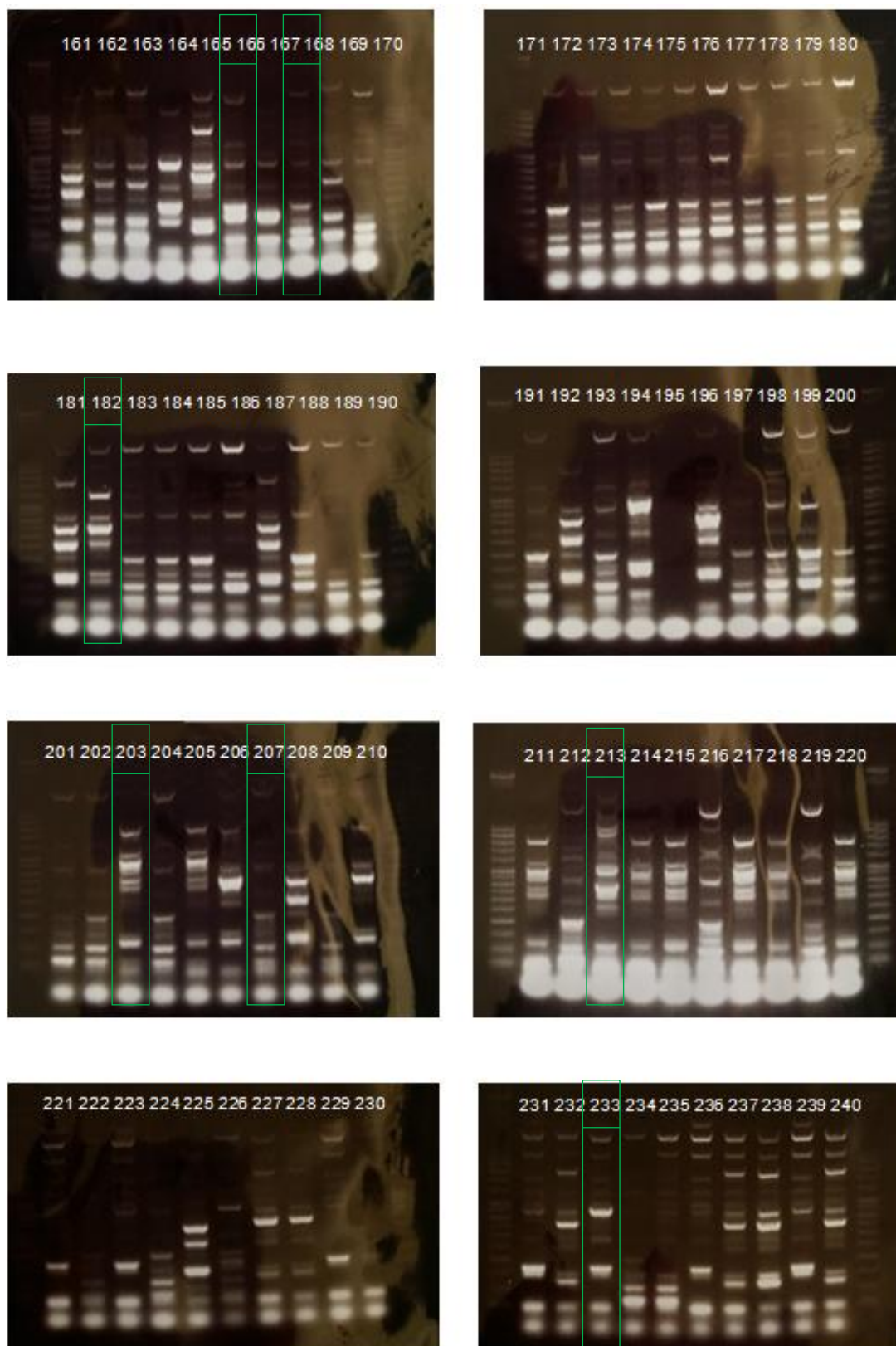


Figura 24. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 161 a la 240 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Ossian.

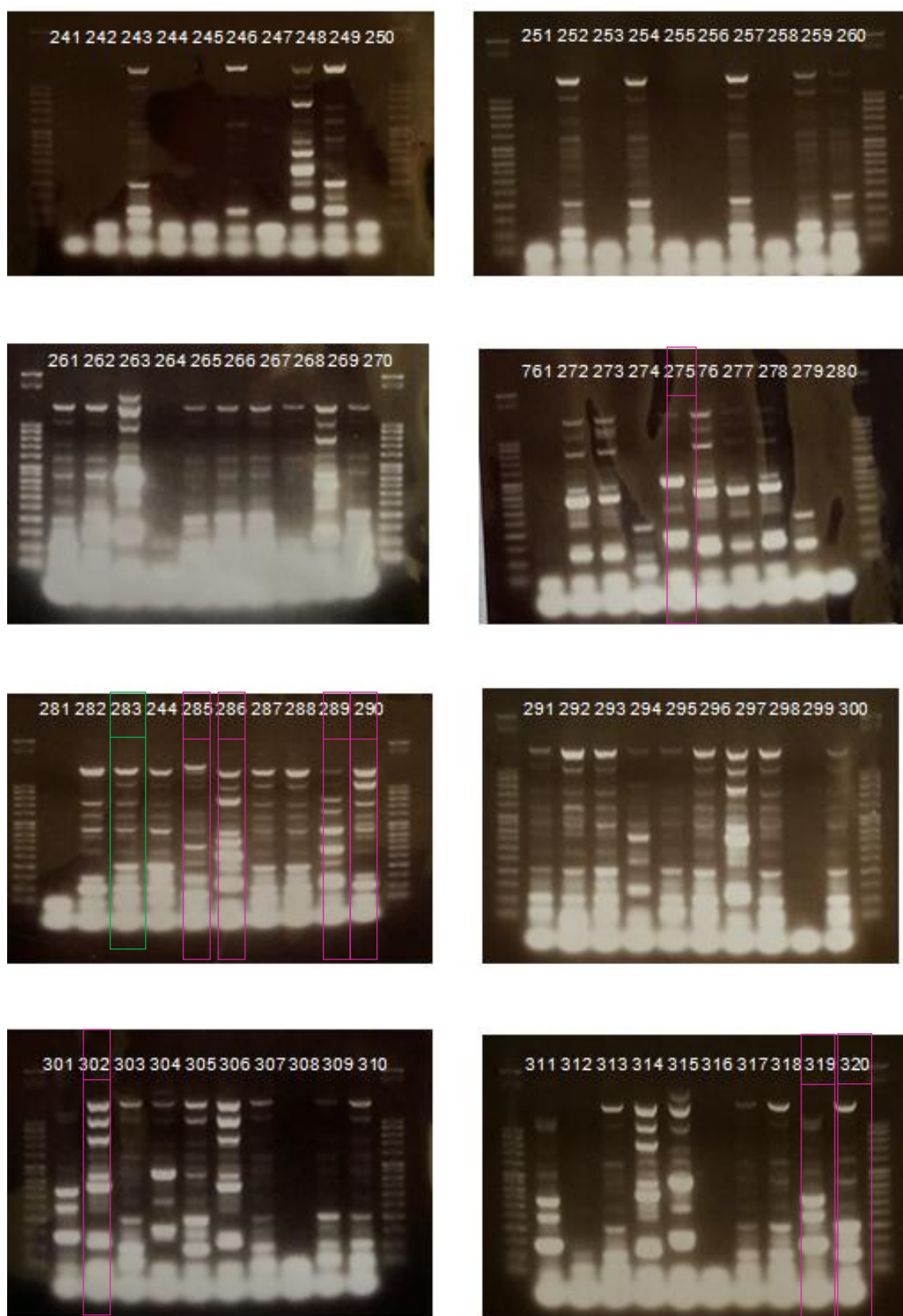


Figura 25. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 241 a la 320 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Ossian.

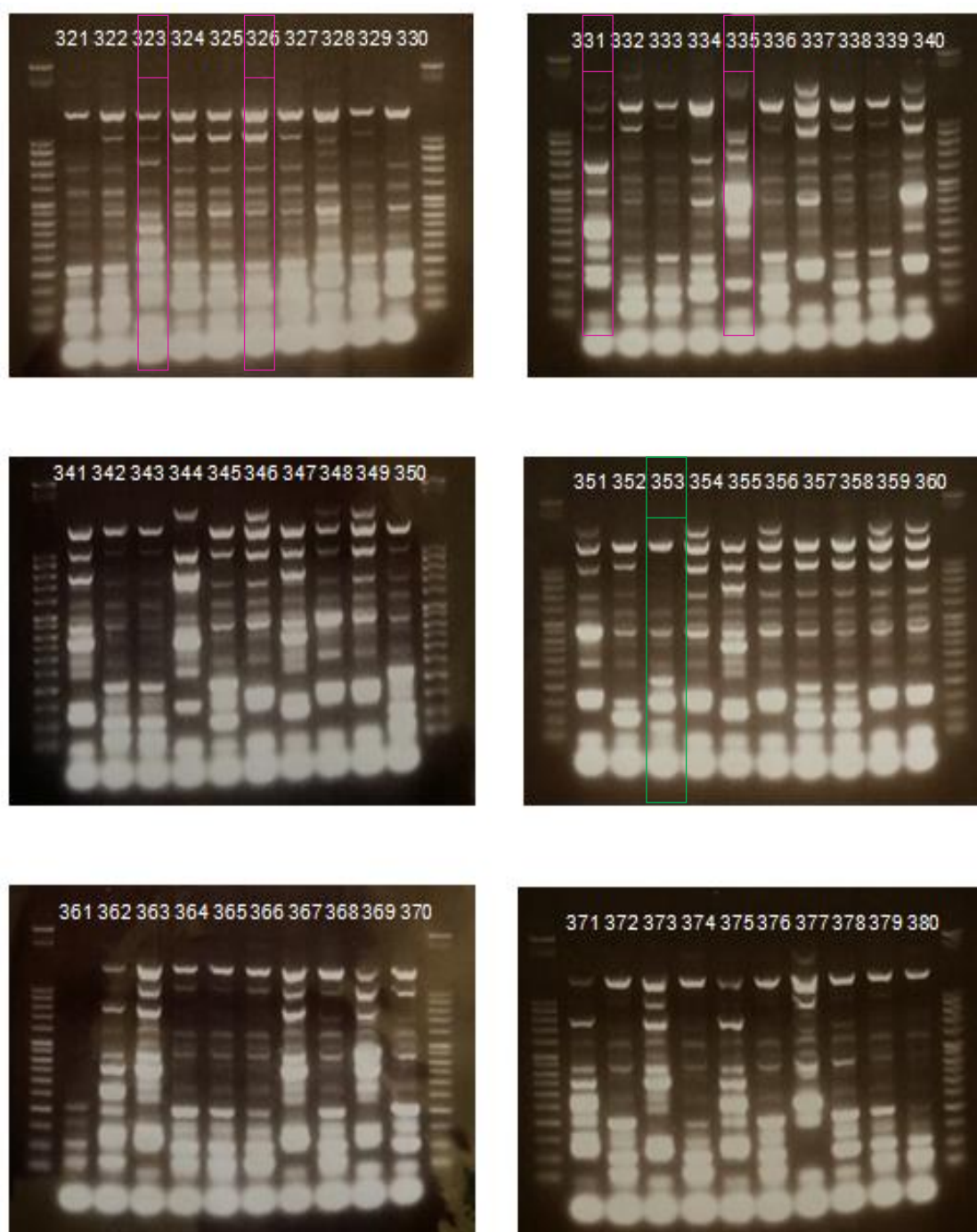


Figura 26. Patrones de bandas obtenidos por amplificación por PCR de la región interdelta de cepas de la 321 a la 380 de *S. cerevisiae* aisladas en mostos fermentados en la bodega Ossian.

### 4.1.3. Identificación molecular de levaduras a nivel de especie: Secuenciación de la región D1/D2

#### 4.1.3.1. Secuenciación de la región de ADN amplificada e identificación

La identificación genética de las 118 cepas seleccionadas de géneros no-*Saccharomyces*, pertenecientes a 16 especies diferentes se ha realizado por técnicas de secuenciación de la región D1/D2 del ADNr 26S. La secuenciación fue realizada en la casa comercial MacroGen® (Sanger F, 1977).

En la tabla 8 se muestran las cepas secuenciadas de cada especie y el nombre de la especie con la que ha sido identificada tras ser contrastada la secuencia consenso con la base de datos del GenBank (NCBI), así como su número de acceso en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las secuencias obtenidas de dicho proceso se analizaron utilizando el software ClustalW disponible gratuitamente en internet. Una vez obtenida la secuencia consenso utilizando la secuencia para ambos sentidos de la secuenciación (*forward* y *reverse*), esta se contrastó con la base de datos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y se depositó en la base de datos del GenBank.

Tabla 8. Listado de cepas no-*Saccharomyces* secuenciadas e identificadas y su número de acceso en el GenBank.

Nº	Cepa	Especie	Nº acceso GenBank
1	NS-O-70	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KT922793
2	NS-O-73	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KT922795
3	NS-O-82	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KT222663
4	NS-O-105	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KT922824
5	NS-PDC-121	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KT922588
6	NS-PDC-125	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KT922591
7	NS-PDC-129	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KT922594
8	NS-PDC-134	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KT922599
9	NS-PDC-135	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KT922600
10	NS-PDC-261	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	KT922722
11	NS-PDC-262	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	KT922723
12	NS-PDC-243	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	KT922704



Nº	Cepa	Especie	Nº acceso GenBank
13	NS-PDC-248	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	KT922709
14	NS-PDC-249	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	KT922710
15	NS-PDC-254	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	KT922715
16	NS-PDC-257	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	KT922718
17	NS-PDC-132	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	KT922597
18	NS-PDC-178	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	KT922642
19	NS-G-15	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KT922984
20	NS-G-16	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KT922985
21	NS-G-20	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KT922989
22	NS-G-23	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KT922992
23	NS-G-4	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KT922973
24	NS-G-5	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KT922974
25	NS-G-7	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KT922976
26	NS-G-8	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KT922977
27	NS-G-33	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	KT923001
28	NS-G-35	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	KT923003
29	NS-G-39	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	KT923007
30	NS-G-40	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	KT923008
31	NS-G-43	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	KT923011
32	NS-G-47	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	KT923015
33	NS-G-49	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	KT923017
34	NS-G-51	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	KT923019
35	NS-G-53	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	KT923021
36	NS-G-56	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	KT923024
37	NS-EM-CV-1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922276
38	NS-EM-CV-25	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922299
39	NS-EM-VR-101	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922372
40	NS-EM-VR-125	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922396
41	NS-O-1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922724
42	NS-O-23	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922746
43	NS-O-57	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922780
44	NS-O-157	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922876
45	NS-PDC-1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922471
46	NS-PDC-10	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922480
47	NS-PDC-13	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922483
48	NS-PDC-105	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KT922574
49	NS-PDC-100	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KT922569



Nº	Cepa	Especie	Nº acceso GenBank
50	NS-PDC-99	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KT922568
51	NS-EM-HO-136	<i>Lachancea thermotolerans</i>	KT922407
52	NS-EM-MA-67	<i>Lachancea thermotolerans</i>	KT922339
53	NS-EM-VR-119	<i>Lachancea thermotolerans</i>	KT922390
54	NS-G-13	<i>Lachancea thermotolerans</i>	KT922982
55	NS-G-3	<i>Lachancea thermotolerans</i>	KT922972
56	NS-G-32	<i>Lachancea thermotolerans</i>	KT222664
57	NS-O-46	<i>Lachancea thermotolerans</i>	KT922769
58	NS-PDC-75	<i>Lachancea thermotolerans</i>	KT922544
59	NS-PDC-41	<i>Lachancea thermotolerans</i>	KT922510
60	NS-PDC-44	<i>Lachancea thermotolerans</i>	KT922513
61	NS-EM-VR-113	<i>Metschnikowia fructicola</i>	KT922384
62	NS-O-61	<i>Metschnikowia fructicola</i>	KT922784
63	NS-O-69	<i>Metschnikowia fructicola</i>	KT922792
64	NS-O-29	<i>Metschnikowia fructicola</i>	KT922752
65	NS-PDC-14	<i>Metschnikowia fructicola</i>	KT922484
66	NS-PDC-191	<i>Metschnikowia fructicola</i>	KT922655
67	NS-PDC-193	<i>Metschnikowia fructicola</i>	KT922657
68	NS-PDC-194	<i>Metschnikowia fructicola</i>	KT922658
69	NS-PDC-195	<i>Metschnikowia fructicola</i>	KT922659
70	NS-PDC-207	<i>Metschnikowia fructicola</i>	KT922669
71	NS-EM-VR-111	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KT922382
72	NS-O-88	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KT922809
73	NS-O-221	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KT922940
74	NS-O-223	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KT922942
75	NS-O-235	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KT922954
76	NS-PDC-141	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KT922606
77	NS-PDC-143	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KT922608
78	NS-PDC-147	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KT922611
79	NS-PDC-149	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KT922613
80	NS-PDC-150	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KT922614
81	NS-O-32	<i>Metschnikowia viticola</i>	KT922755
82	NS-O-35	<i>Metschnikowia viticola</i>	KT922758
83	NS-O-100	<i>Metschnikowia viticola</i>	KT922819
84	NS-O-110	<i>Metschnikowia viticola</i>	KT922829
85	NS-O-111	<i>Metschnikowia viticola</i>	KT922830
86	NS-O-118	<i>Metschnikowia viticola</i>	KT922837

Nº	Cepa	Especie	Nº acceso GenBank
87	NS-O-97	<i>Metschnikowia viticola</i>	KT922816
88	NS-O-45	<i>Metschnikowia viticola</i>	KT922768
89	NS-O-120*	<i>Metschnikowia viticola</i> *	KT922839
90	NS-G-57	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KT923025
91	NS-G-61	<i>Rhodospordium toruloides</i>	KT923029
92	NS-G-70	<i>Rhodospordium toruloides</i>	KT923038
93	NS-G-24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT922993
94	NS-G-30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT922999
95	NS-G-31	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT923000
96	NS-G-37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT923005
97	NS-G-42	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT923010
98	NS-G-44	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT923012
99	NS-G-48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT923016
100	NS-G-50	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT923018
101	NS-G-52	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT923020
102	NS-G-54	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT923022
103	NS-G-55	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KT923023
104	NS-G-27	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	KT922996
105	NS-G-46	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	KT923014
106	NS-G-62	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	KT923030
107	NS-G-66	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	KT923034
108	NS-G-71	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	KT923039
109	NS-G-72	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	KT923040
110	NS-G-9	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	KT922978
111	NS-PDC-169	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	KT922633
112	NS-G-34	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KT923002
113	NS-O-11	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KT922734
114	NS-O-14	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KT922737
115	NS-PDC-167	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KT922631
116	NS-PDC-171	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KT922635
117	NS-G-58	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	KT923026
118	NS-G-63	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	KT923031

\*NS-O-120, al inicio del estudio, por error, estaba identificada como *H. uvarum*, cuando realmente es *M. viticola* (ver apartado resultados).

De acuerdo con los estudios de Kurtzman y Robnett, 1994 y Cai et.al. 1996 el uso de la secuenciación de ácidos nucleicos con fines taxonómicos de levadura ha señalado discrepancias, entre su fenotipo y el genotipo. Además, en algunos casos, la identificación

convencional no presenta poder discriminatorio suficiente para clasificar especies recientemente descritas (Cendejas-Bueno, 2010). Por ejemplo, los resultados aportados por la secuenciación del ADNr 26S en nuestro trabajo por lo general ha permitido identificar con un grado de certeza suficientemente bueno para la mayoría de las especies estudiadas; sin embargo, en casos concretos como los aislamientos de las especies *M. pulcherrima* y *M. fructicola* la identificación en bases a esas secuencias no generó resultados concluyentes. Es más, del análisis posterior por MALDI TOF-MS condujo a pensar que la identificación en base a secuencias era errónea como se discute en el apartado 4.2.4.

## **4.2. Técnica espectrometría de masas MALDI-TOF MS**

### **4.2.1. Optimización de la preparación muestra para análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF MS**

La optimización se realizó aplicando, esencialmente, el método descrito en el apartado 3.4.2.2. de la Parte Experimental, modificando la/s variable/s estudiada/s y manteniendo el resto constantes.

Los ensayos preliminares se realizaron inicialmente preparando las muestras a partir de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y no-*Saccharomyces*. Estos ensayos se basaron en la información encontrada en la bibliografía sobre los diferentes modos de crecimiento de levaduras y preparación de la muestra. Se estudió el crecimiento de las levaduras en diferentes medios de cultivo, observando diferencias mínimas en los espectros de masas obtenidos. También se confirmó que el tiempo de crecimiento de la levadura debe ser del orden de 20-24 horas, ya que los espectros de masas obtenidos para análisis de cultivos de más de 48 horas son muy pobres en cuanto al número e intensidad de iones detectados. En la bibliografía se dispone de estudios que han comprobado que se pueden analizar microorganismos con tiempos de cultivo de hasta 72 horas (Agustini, 2014), definiendo en 48 horas el tiempo óptimo de crecimiento (Marklein, 2009) (Pinto, 2011); sin embargo, en los experimentos realizados en este trabajo se ha comprobado que el mayor rendimiento de la extracción de proteínas se obtiene en el margen entre 20 y 24 horas; por

lo tanto, se han reducido los tiempos de crecimiento, respecto a estas publicaciones, consiguiendo una extracción óptima de proteínas. Adicionalmente, estos estudios afirman que los resultados obtenidos para las cepas de la especie *S. cerevisiae* son más dependientes del tiempo de crecimiento que en otras especies.

Otro parámetro estudiado fue la implementación del método de lisis de las células mediante la utilización de bolas de cristal para favorecer la ruptura de la pared celular, observándose que existen diferencias mínimas en los espectros de masas obtenidos, por lo que no se aplica en el procedimiento utilizado, evitando así una posible fuente de contaminación en el lavado previo de las bolas. Se han encontrado estudios en los que el empleo de bolas de cristal mejora el rendimiento de extracción de proteínas; sin embargo, en estos casos no se trata de muestras de levaduras sino de bacterias cuya pared celular es más gruesa (Usbeck, 2013).

Otra variable estudiada fue el modo de agitación utilizado en cada una de las etapas del procedimiento de extracción de las proteínas; se empleó baño de ultrasonidos y vortex, observándose que los mejores resultados se obtenían al realizar agitación con vortex. Una variable introducida respecto a las referencias bibliográficas ha sido realizar las centrifugaciones en frío (a 4°C) durante el proceso de extracción de las proteínas; esto favorece por un lado la precipitación de las mismas facilitando su coagulación; por otro lado, se minimiza la degradación de las proteínas aumentando el rendimiento de extracción.

Paralelamente, se estudió la forma de realizar la extracción de proteínas propiamente dicha. De acuerdo con la bibliografía se dispone principalmente de tres métodos que han sido aplicados en este trabajo (Usbeck, 2013); el primero es un método directo basado en la aplicación directa de una colonia de levadura sobre la placa; en el segundo método, la extracción de proteínas se realiza en el propio pocillo de la placa, añadiendo una gota de AcF sobre la muestra de levadura depositada en el pocillo; por último, el tercer método se basa en realizar el procedimiento de extracción de proteínas fuera de la placa implicando su realización mayores tiempos. Sin embargo, este último método es el que se ha aplicado en esta tesis, ya que los resultados obtenidos en las muestras en las que se aplicaron el primer y

segundo método no dieron lugar a espectros de masas aceptables en cuanto al número de proteínas detectadas e intensidad de los iones. Sin embargo, Theel et al. encontraron que el método directo basado en la extracción de proteínas sobre la placa añadiendo ácido fórmico produce porcentajes de identificación que eran similares a los obtenidos mediante el método de extracción fuera de la placa (Theel, 2012). Van Herendael et al. demostraron que el análisis MALDI-TOF MS utilizando el método de extracción de proteínas sobre la placa era adecuado para una rápida identificación de los aislados de levadura pero su uso requiere que el umbral de identificación sea más bajo (<1,7, según la nomenclatura del fabricante - Bruker-) por lo que finalmente resulta menos recomendable para una adecuada identificación (Van Herendael, 2012)

Puesto que los espectros de masas obtenidos en los estudios preliminares presentaban una gran variabilidad, debido a la heterogeneidad característica del tipo de cepa, se decidió estudiar el procedimiento utilizando una única cepa de levadura. Se preparó un *pool* de una cepa de levadura seleccionada en cantidad previsiblemente suficiente para poder realizar un estudio completo de las diferentes variables utilizando este único *pool*. La cepa utilizada está identificada mediante métodos moleculares como *S. cerevisiae* S-EM-37, y fue aislada de la bodega Emilio Moro. Con el fin de minimizar posibles variaciones de las condiciones de trabajo y tener en todo momento disponibilidad de muestra, se congeló el *pool* de levadura de S-EM-37 a -20°C tras la etapa de lavado con agua y etanol, previa al proceso de extracción de proteínas; después del centrifugado, se conservó el pellet seco y se conservó a -20°C durante al menos cuatro días quedando disponible para su análisis. El proceso de congelación llevado a cabo, adicionalmente favorece la ruptura de la pared celular debido a la formación de micro cristales por congelación.

Instrumentalmente, uno de los principales problemas que presenta la técnica MALDI-TOF MS es la reproducibilidad en cuanto a la intensidad de las señales de las diferentes *m/z*. Esta variabilidad es debida entre otros factores, a la temperatura de análisis, naturaleza de la matriz y la muestra, y principalmente a la variabilidad en el proceso de co-cristalización de la muestra con la matriz.

Para evaluar el efecto de las diferentes variables se han seleccionado tres relaciones  $m/z$  consideradas representativas, por su intensidad y distribución en el espectro de masas, concretamente en torno a las relaciones  $m/z$ , 6.543 Da, 8.468 Da y 11.563 Da.

A modo de ejemplo, en la figura 27, se incluye un zoom en el margen de masa en el que aparecen los tres iones representativos en los espectros de masas correspondientes a la optimización de la cantidad de muestra.

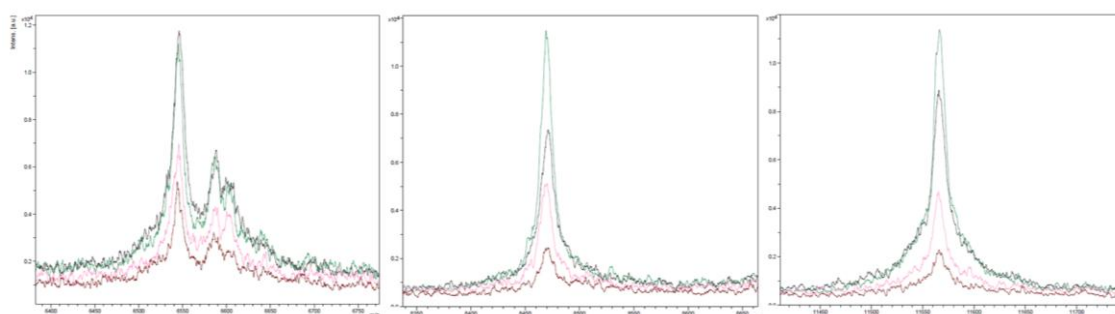


Figura 27. Iones representativos entorno a las relaciones  $m/z$ , 6.543 Da, 8.468 Da y 11.563 Da para cantidades de muestra de 1mg (verde), 3mg (negro), 5 mg (rosa), 8 mg (rojo)

Tabla 9. Variables estudiadas en la optimización

PARAMETRO ESTUDIADO	MARGEN ESTUDIADO	SELECCIONADO
<b>Tipo de placa MALDI</b>	-384 massive -Anchorchip	Anchorchip
<b>Naturaleza de la matriz</b>	-HCCA -SA -DHB	HCCA
<b>Cantidad de muestra</b>	-1 mg -3 mg -5 mg -8 mg	3 mg
<b>Naturaleza y concentración del ácido</b>	-TFA (2%) -TFA (20%) -TFA (40%) -TFA (60%) -AcF (60%) -AcF (70%) -AcF (80%) -AcF (90%)	AcF (70%)
<b>Relación AcF:ACN</b>	-100 $\mu$ L:100 $\mu$ L -110 $\mu$ L:90 $\mu$ L -120 $\mu$ L:80 $\mu$ L	100 $\mu$ L:100 $\mu$ L

PARAMETRO ESTUDIADO	MARGEN ESTUDIADO	SELECCIONADO
<b>Cantidad de AcF:ACN (1:1) para 1 y 3 mg</b>	-10 µL:10µL -25 µL:25µL -50 µL:50µL -100 µL:100µL	100µL:100µL
<b>Efecto de la forma de adición de la mezcla AcF: ACN</b>	-Secuencial -En mezcla	Secuencial
<b>Estabilidad de la matriz y OS</b>	-Preparación antes de analizar -OS preparado hace 2 semana	Preparación antes de analizar
<b>Efecto de la variación del porcentaje de ACN en la disolución OS (2,5%TFA)</b>	-25%ACN -50%ACN -75%ACN -80%ACN -90%ACN	75%ACN
<b>Efecto de la variación del porcentaje de TFA en la disolución OS (75%ACN)</b>	-3%TFA -2,5%TFA -1,5%TFA -0,5%TFA -0,1%TFA	2,5%TFA
<b>Efecto de la variación simultanea del porcentaje de ACN y TFA en la disolución OS</b>	-25%ACN-2,5%TFA -50%ACN-2,5%TFA -75%ACN-2,5%TFA -50%ACN-1%TFA -25%ACN-5%TFA	75%ACN-2,5%TFA
<b>Efecto de la dilución y cantidad de matriz</b>	-Sin diluir -Dilución 1:10 (1 µL) -Dilución 1:10 (2 µL)	Sin diluir
<b>Volúmenes de muestra y matriz añadidos</b>	-1:1 -2:1 -2:2	2:1
<b>Efecto sándwich matriz-muestra-matriz</b>	-Normal 50%ACN-P384 -Normal 75%ACN-P384 -Sandw. 50%ACN-P384 -Sandw. 75%ACN-P384 -Normal 50%ACN-PAch -Normal 75%ACN-PAch -Sandw. 50%ACN-PAch -Sandw. 75%ACN-PAch	Normal 75%ACN- Placa Ach
<b>Efecto modo depositar muestra y matriz</b>	-Depositar muestra, secar al aire y añadir matriz. -Depositar muestra, y sin secar añadir matriz, - Depositar muestra y sin secar, añadir matriz y mezclar pipeteando tres	Depositar mues-tra, secar al aire y añadir matriz.

	<p>veces mediante succión-deposición.</p> <p>-Igual que el anterior excepto con secado al aire de la muestra.</p>	
<p><b>Efecto adición de disolventes previamente o posteriormente a la deposición de muestra-matriz</b></p>	<p>-Ausencia de adición</p> <p>-Gota previa-2 µL isopropanol+2 µL hexano</p> <p>-1µLGota post-25%ACN</p> <p>-1µLGota post-50%ACN</p> <p>-1µLGota post-70%ACN</p> <p>-1µLGota post-75%ACN</p> <p>-1µLGota post-100%ACN</p> <p>-1µLGota post-100%agua</p>	<p>Gota previa 2 µL isopropanol+2 µL hexano</p>

En la tabla 9 se resumen las variables estudiadas, que afectan al tipo de placa, preparación de la muestra, matriz y disolución OS, así como en su caso los márgenes en estudio y las condiciones de trabajo seleccionadas.

#### 4.2.1.1. Tipo de placa MALDI

La naturaleza y forma de los pocillos influye en la forma que adopta la gota de la muestra-matriz en el pocillo, condicionada por la tensión superficial de la gota depositada, que a su vez es función de la composición de la gota dando lugar a la morfología de los cristales formados de la mezcla muestra-matriz en el pocillo. En particular, los pocillos de la PAC disponen de las denominadas “anclas” que tienen la capacidad de focalizar la gota produciendo intensidades de relación  $m/z$  mayores que las de la placa 384 massive, también ensayada. En consecuencia la PACTM es la que presenta mejores resultados. En la tabla 20 y figura 50 del apartado 4.2.1.4.7. (Efecto sándwich matriz-muestra-matriz) se incluyen resultados comparativos de ambas placas en el estudio de otras variables.

#### 4.2.1.2. Naturaleza de la matriz

Se han ensayado las matrices más comúnmente utilizadas para la ionización mediante MALDI en el análisis de proteínas, tales como HCCA, SA, 2,5-DHB, habiéndose producido una ionización adecuada únicamente cuando se utiliza la matriz HCCA. A lo largo de la tesis se



muestran espectros de masas correspondientes al análisis de las muestras utilizando HCCA como matriz.

### **4.2.1.3. Muestra**

#### **4.2.1.3.1. Cantidad de muestra**

Se han estudiado cantidades de muestra en el margen entre 1 y 8 mg por triplicado realizando tres medidas de espectros por cada pocillo. En términos generales, en los ensayos realizados, al aumentar la cantidad de muestra disminuyó la intensidad de respuesta y la precisión de los tres iones representativos, así como su resolución en el espectro de masas aumentando el ruido de fondo. Los mejores resultados se obtuvieron con cantidades de muestra entre 1 y 3 mg. No se utilizaron cantidades de 1 mg o inferiores a 1 mg debido a las dificultades en el manejo de muestra y en la operación de pesada. En la figura 28, se presentan los espectros de masas obtenidos para las diferentes cantidades de muestra, en la tabla 10 se resumen los resultados que se visualizan en la figura 29.

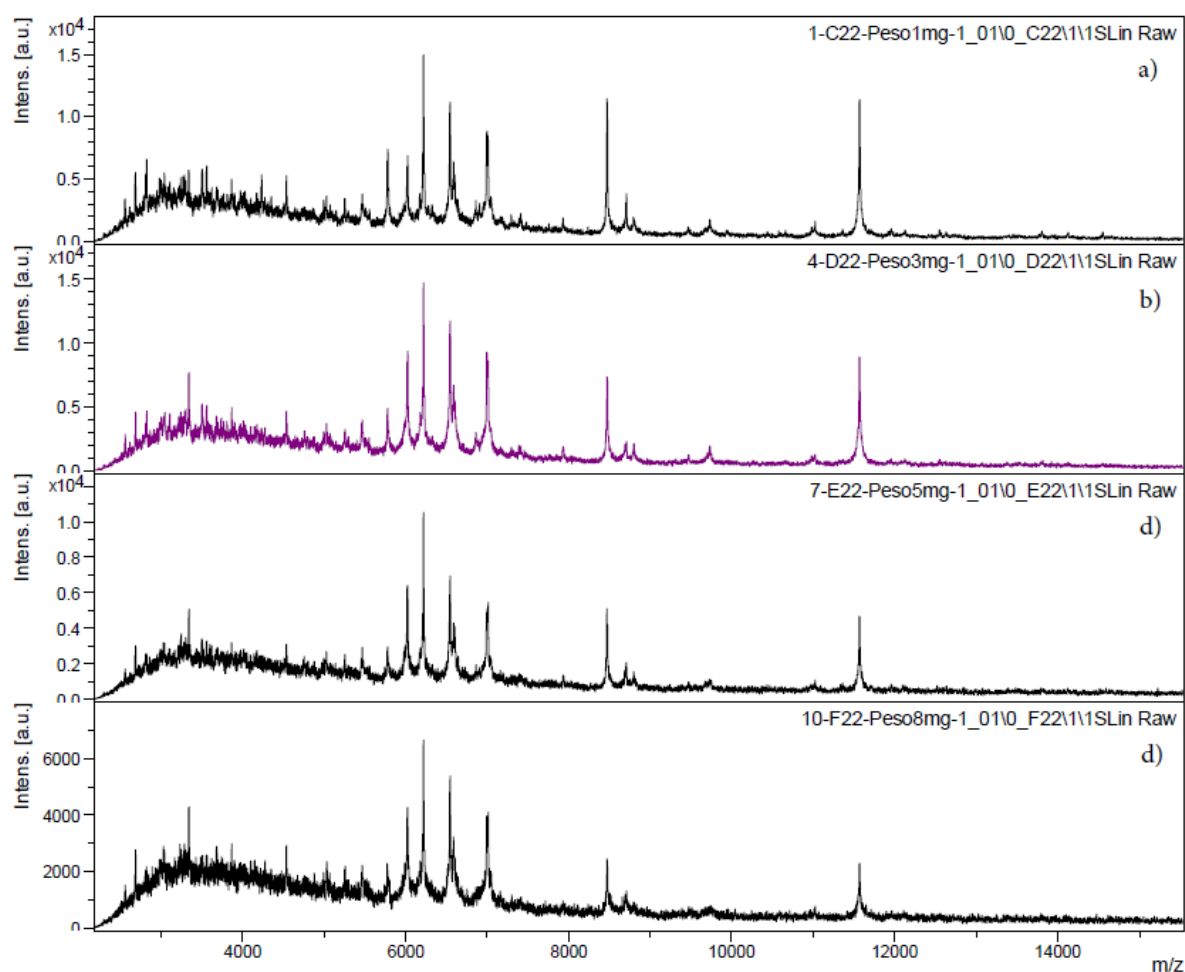


Figura 28. Espectros de masas obtenidos en la optimización de la cantidad de muestra, a) 1 mg, b) 3 mg, c) 5 mg, d) 8 mg

Tabla 10. Optimización de la cantidad de muestra

CANTIDAD DE MUESTRA-variable mg-100µLAcF(70%):100µL ACN (1:1); OS 75%ACN 2,5%TFA							
1 mg	INTENSIDADES relación m/z			3 mg	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	11.120	11.411	11.263	1-01	11.725	7.256	8.484
1-02	8.828	10.262	11.505	1-02	4.316	2.834	3.443
1-03	6.291	6.143	7.000	1-03	6.329	4.726	5.548
2-01	6.188	5.554	6.983	2-01	9.922	7.450	6.488
2-02	7.864	8.245	9.855	2-02	6.369	4.117	4.270
2-03	5.888	6.526	6.990	2-03	6.055	5.320	5.133
3-01	8.735	8.356	9.760	3-01	4.499	3.398	3.728
3-02	9.501	9.482	9.691	3-02	7.155	4.767	5.062
3-03	17.098	16.773	19.389	3-03	14.106	11.587	11.891
Media	9.057	9.195	10.271	Media	7.831	5.717	6.005
S	3.475	3.443	3.852	S	3.361	2.695	2.684
DER	38	37	38	DER	43	47	45

5 mg	INTENSIDADES relación m/z			8 mg	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	6.354	5.046	4.580	1-01	5.264	2.170	2.146
1-02	3.727	2.756	2.269	1-02	5.545	3.658	3.435
1-03	7.802	5.537	5.696	1-03	5.008	2.989	2.870
2-01	3.853	2.603	3.096	2-01	3.540	1.911	1.698
2-02	7.907	6.848	3.055	2-02	3.833	2.477	2.190
2-03	5.479	3.859	7.371	2-03	3.088	1.759	1.798
3-01	4.962	3.218	3.442	3-01	8.984	4.716	4.886
3-02	7.636	5.466	3.715	3-02	3.184	1.734	1.934
3-03	8.389	9.986	8.793	3-03	4.108	2.226	2.170
Media	6.234	5.035	4.669	Media	4.728	2.627	2.570
S	1.804	2.346	2.197	S	1.831	1.001	1.028
DER	29	47	47	DER	39	38	40

\*El primer número correspondiente al número de pocillo y el segundo número al número de disparo en ese mismo pocillo

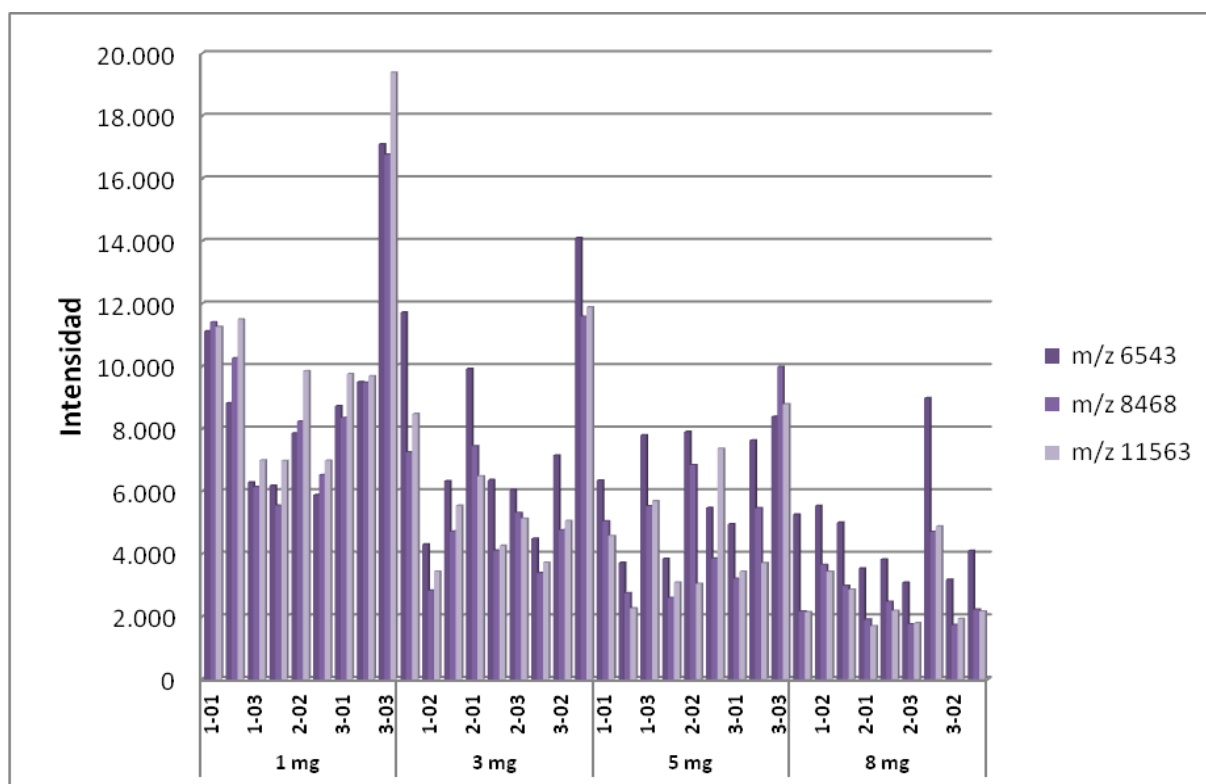


Figura 29. Optimización de la cantidad de muestra

#### 4.2.1.3.2. Naturaleza y concentración del ácido

Se han realizado experimentos utilizando diferentes concentraciones de AcF y TFA como agentes responsables de la disrupción de la pared celular con la consecuente liberación de las proteínas al medio. Se ha empleado TFA a concentraciones entre 2 y 60%, observándose en la figura 30 que los espectros de masas obtenidos presentan intensidades bajas de los iones representativos; en cambio, para una concentración del 70% de AcF el espectro de masas presenta intensidades iónicas mayores (ver figura 31). En consecuencia, se han estudiado concentraciones de AcF de 60, 70, 80 y 90%. En la tabla 11 y figuras 31 y 32 se pone de manifiesto que al aumentar la concentración de AcF la intensidad de los iones aumenta, obteniéndose intensidades máximas para una concentración del 70%; cuando se emplean porcentajes superiores la intensidad disminuye progresivamente. Cabe resaltar que para porcentajes del 70% de AcF la precisión es máxima, con DER mínimas.

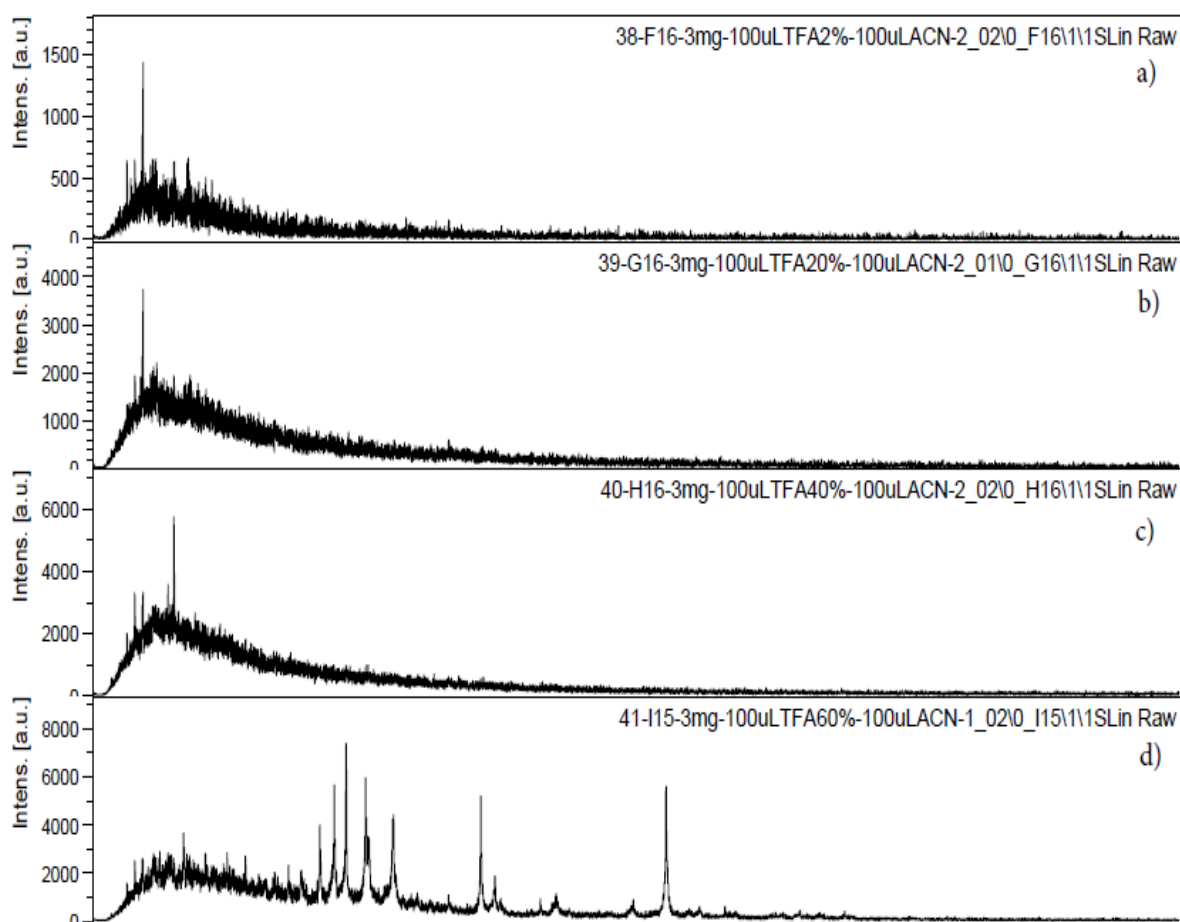


Figura 30. Espectros de masas obtenidos en la optimización de la concentración del TFA, a) TFA 2%, b) TFA 20%, c) TFA 40%, d) TFA 60%

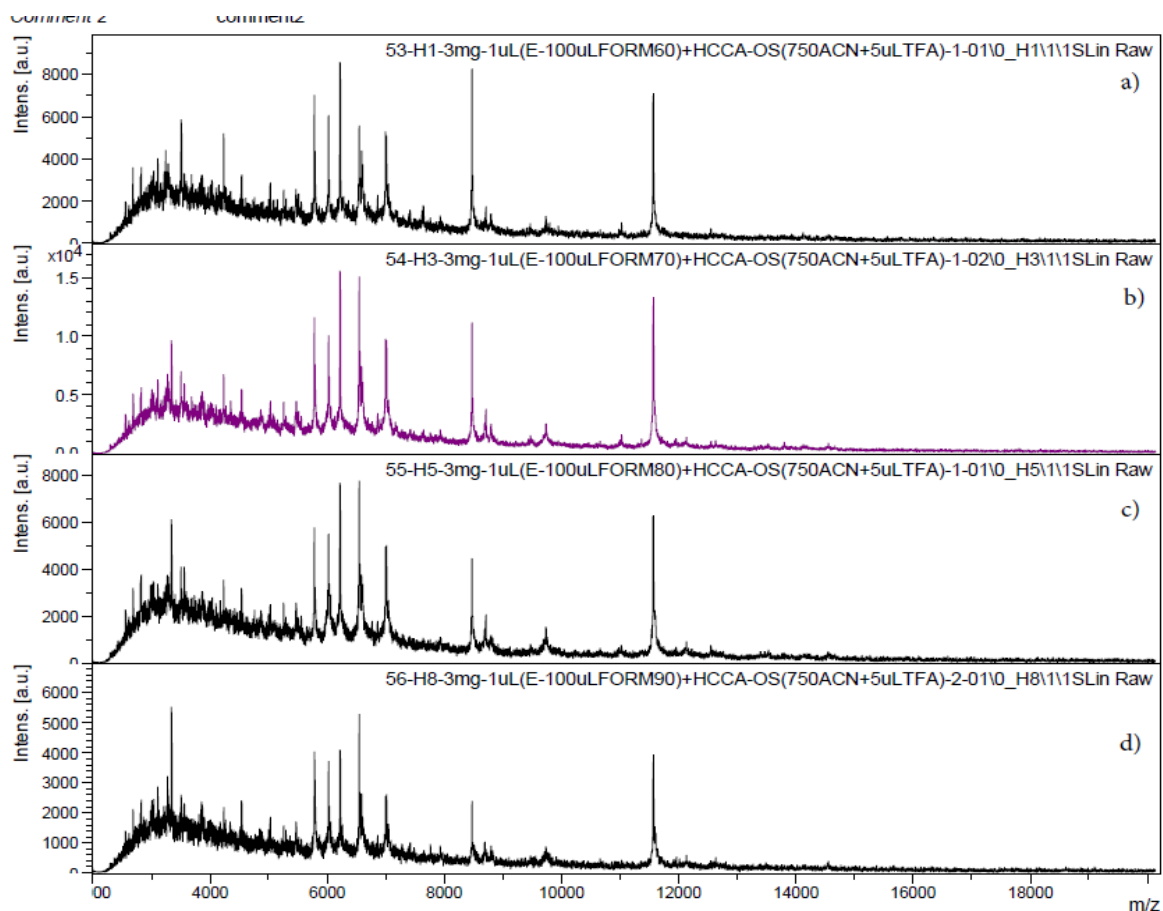


Figura 31. Espectros de masas obtenidos en la optimización de concentración del AcF, a) 60%, b) 70%, c) 80%, d) 90%

Tabla 11. Optimización de la concentración del AcF

EFECTO % AcF-3 mg-100µLAcF(variable%):100µLACN (1:1); OS 75%ACN 2,5%TFA; 1µL(secar)+1µL HCCA							
ÁcF60%	INTENSIDADES relación m/z			ÁcF70%	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	5.461	8.014	7.127	7.127	15.552	13.333	13.981
1-02	8.862	12.704	12.066	12.066	14.778	11.163	13.328
1-03	11.316	12.346	11.961	11.961	15.293	12.177	13.528
1-04	9.907	11.677	12.601	12.601	13.777	10.678	11.618
Media	8.887	11.185	10.939	Media	14.850	11.838	13.114
S	2.495	2.157	2.557	S	784	1.176	1.034
DER	28	19	23	DER	5	10	8
ÁcF80%	INTENSIDADES relación m/z			ÁcF90%	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	7.754	4.427	6.275	7.127	9.094	2.995	6.531
1-02	6.310	3.764	5.072	12.066	6.074	2.826	5.426
1-03	9.733	4.817	8.813	11.961	5.282	2.177	3.943
1-04	8.459	6.652	7.567	12.601	7.887	5.222	6.260

<b>Media</b>	8.064	4.915	6.932	<b>Media</b>	7.084	3.305	5.540
<b>S</b>	1.428	1.237	1.616	<b>S</b>	1.727	1.326	1.164
<b>DER</b>	18	25	23	<b>DER</b>	24	40	21

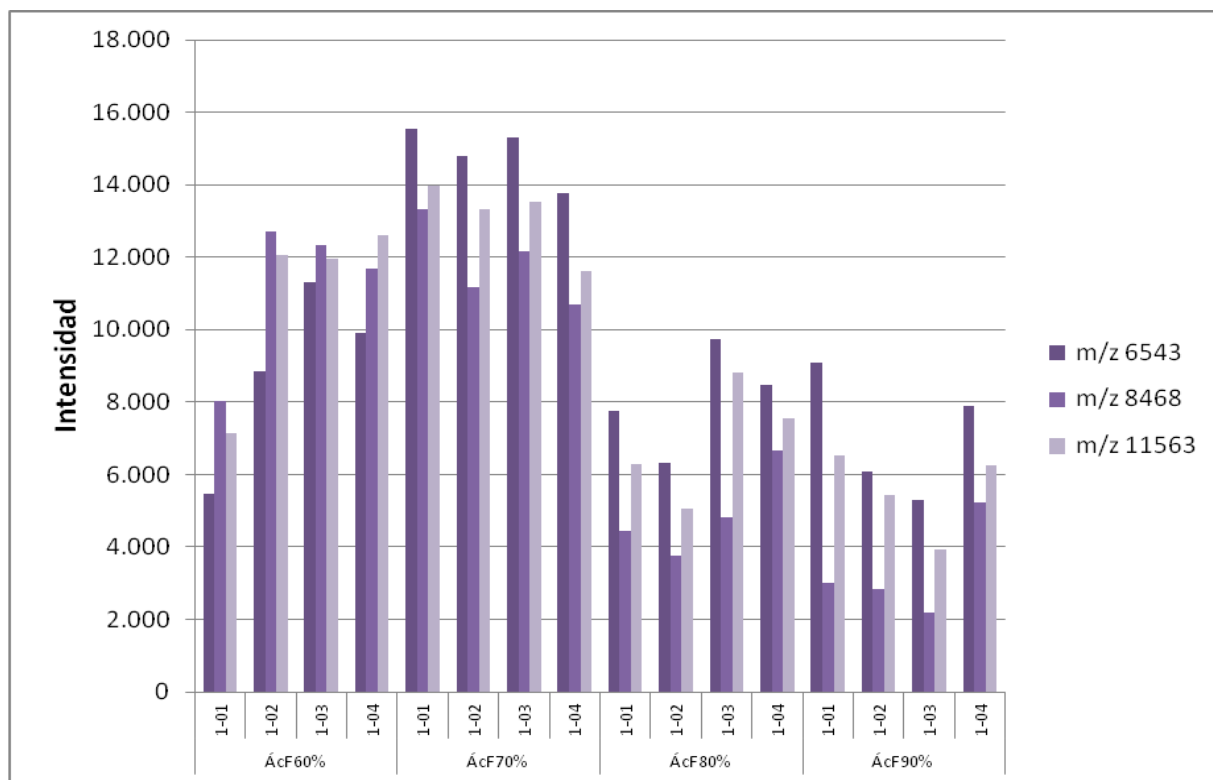


Figura 32. Optimización de la concentración del AcF

#### 4.2.1.3.3. Relación AcF:ACN

Los volúmenes y relaciones AcF:ACN estudiados han sido, 100:100, 110:90 y 120:80 v:v, AcF:ACN, respectivamente. Los espectros de masas resultantes se muestran en la figura 33. El mejor resultado se obtiene claramente para la relación 1:1 con volúmenes de 100  $\mu$ L AcF y 100  $\mu$ L ACN.

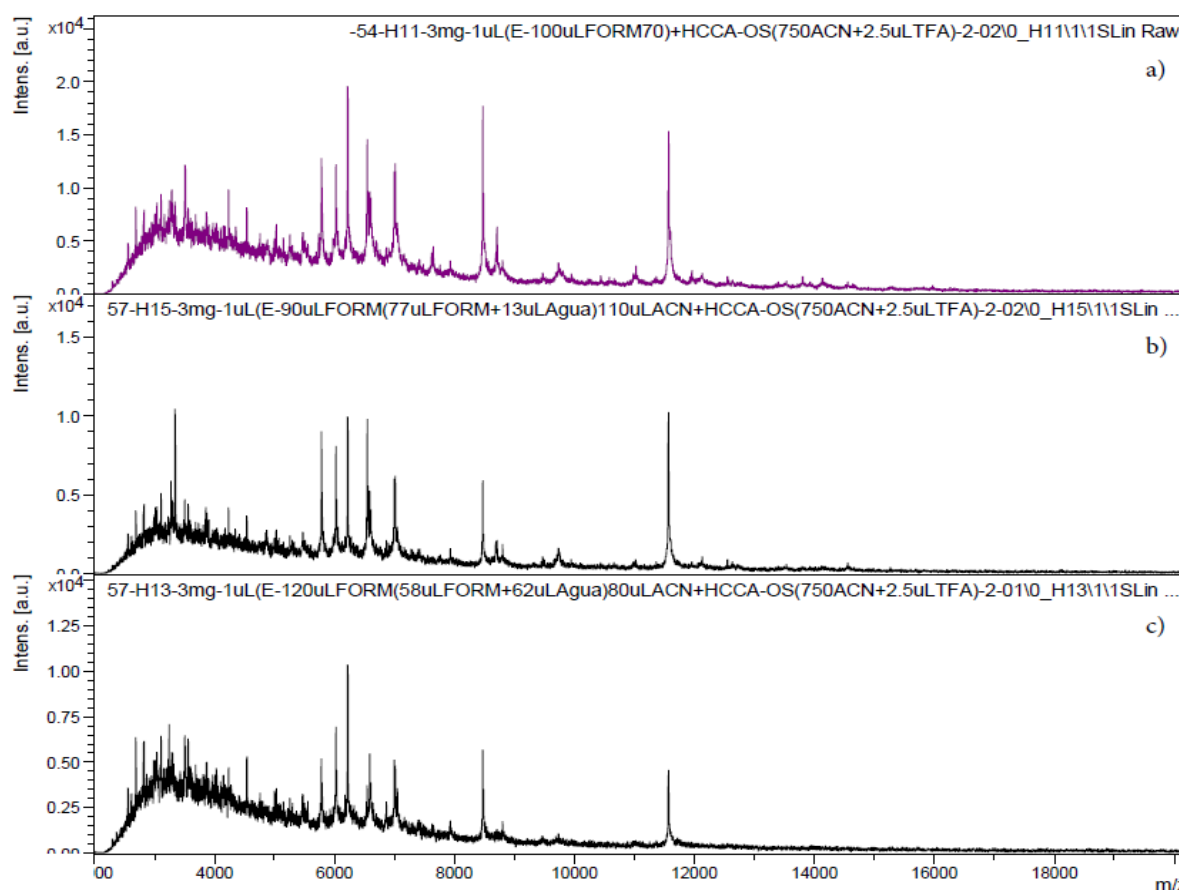


Figura 33. Espectros de masas obtenidos en la optimización de la relación AcF:ACN, a) 100  $\mu$ L AcF:100  $\mu$ L ACN, b) 110  $\mu$ L AcF:90  $\mu$ L ACN y c) 120  $\mu$ L AcF:80  $\mu$ L ACN

#### 4.2.1.3.4. Cantidad de AcF y ACN con relación 1:1

En menor medida que el AcF, el ACN también provoca la disrupción de la pared celular de la levadura, con la consecuente liberación de las proteínas al medio. Utilizando las cantidades de muestra óptimas de 1 y 3 mg seleccionadas de acuerdo con las conclusiones del apartado anterior y una relación constante AcF:ACN, se estudiaron diferentes cantidades de la mezcla AcF:ACN. La cantidad de AcF:ACN más adecuada para la preparación de la muestra fue función de la cantidad de levadura empleada. Se seleccionó como óptima la cantidad de muestra de 3 mg con una cantidad de 100  $\mu$ L AcF:100  $\mu$ L ACN. En la figura 34, se presentan los espectros de masas obtenidos para las diferentes cantidades de AcF:ACN, en las tablas 12 y 13 se muestran los resultados obtenidos para 1 mg y 3 mg de muestra, respectivamente y en la figura 35 se visualizan estos resultados. Se prepararon 2 pocillos de cada cantidad AcF y ACN registrando 4 espectros por pocillo.

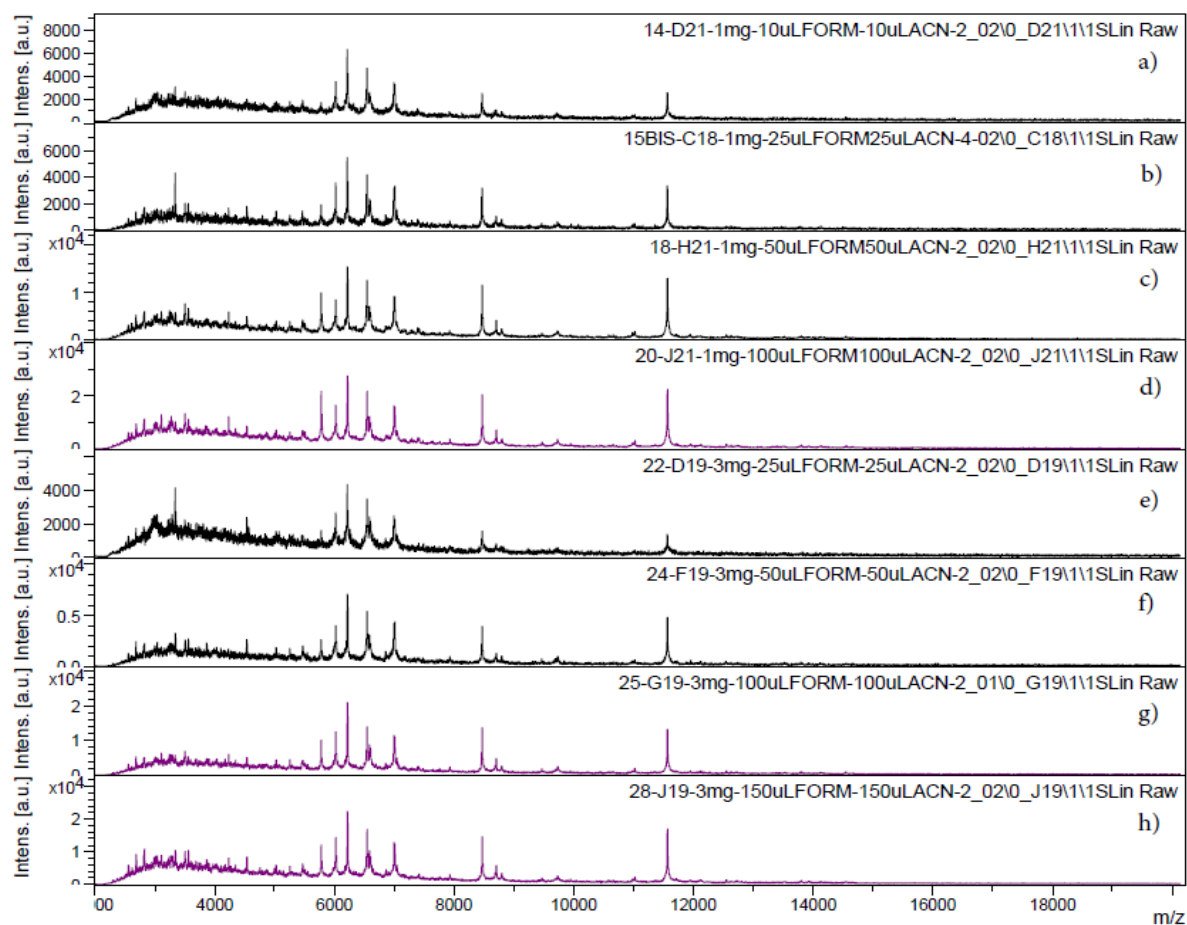


Figura 34. Espectros de masas obtenidos en la optimización de la cantidad de AcF:ACN en la relación 1:1, a) 10 $\mu$ LAcF:10 $\mu$ LACN-1mg, b) 25 $\mu$ LAcF:25 $\mu$ LACN-1mg, c) 50 $\mu$ LAcF:50 $\mu$ LACN-1mg, d) 100 $\mu$ LAcF:100 $\mu$ LACN-1mg, e) 25 $\mu$ LAcF:25 $\mu$ LACN-3mg, f) 50 $\mu$ LAcF:50 $\mu$ LACN-3mg, g) 100 $\mu$ LAcF:100 $\mu$ LACN-3mg, h) 150 $\mu$ LAcF:150 $\mu$ LACN-3mg

Tabla 12. Optimización de la cantidad de AcF:ACN en la relación 1:1 para 1 mg de muestra

CANTIDAD DE AcF:ACN (1:1)-1 mg-variable $\mu$ L AcF(70%):variable $\mu$ LACN (1:1); OS 75%ACN 2,5%TFA							
10 $\mu$ L:10 $\mu$ L	INTENSIDADES relación m/z			25 $\mu$ L:25 $\mu$ L	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	9.683	6.662	6.558	1-01	6.812	6.774	7.010
1-02	7.133	4.738	4.704	1-02	17.196	15.117	15.913
1-03	8.474	3.897	3.762	1-03	12.719	10.064	10.976
1-04	6.832	3.615	3.960	1-04	7.715	5.524	6.072
2-01	6.185	3.967	4.080	2-01	5.892	5.108	6.046
2-02	4.967	2.272	2.829	2-02	11.431	9.854	10.400
2-03	4.887	3.506	3.490	2-03	8.173	5.881	6.224
2-04	4.692	2.510	2.418	2-04	4.865	3.326	4.239
Media	6.607	3.896	3.975	Media	9.350	7.706	8.360
S	1.803	1.371	1.267	S	4.137	3.779	3.817
DER	27	35	32	DER	44	49	46



50µL:50µL	INTENSIDADES relación m/z			100µL:100µL	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	7.256	6.343	7.401	1-01	12.408	11.159	15.815
1-02	11.442	12.438	11.816	1-02	12.090	13.124	15.888
1-03	9.981	8.442	10.457	1-03	6.076	5.763	8.292
1-04	16.380	15.260	16.789	1-04	14.078	12.031	16.332
2-01	14.036	12.611	15.298	2-01	10.566	12.594	13.263
2-02	7.965	5.572	7.647	2-02	14.501	14.809	15.305
2-03	5.862	5.094	5.775	2-03	9.959	10.111	12.660
2-04	12.554	11.574	12.732	2-04	21.357	20.238	22.364
Media	10.685	9.667	10.989	Media	12.629	12.479	14.990
S	3.598	3.808	3.918	S	4.415	4.118	3.983
DER	34	39	36	DER	35	33	27

Tabla 13. Optimización de la cantidad de AcF:ACN en la relación 1:1 para 3 mg de muestra

CANTIDAD DE AcF:ACN (1:1)-3 mg-variable µLAcF:variable µLACN (1:1); OS 75%ACN 2,5%TFA							
10µL:10µL	INTENSIDADES relación m/z			25µL:25µL	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	5.381	4.262	4.174	1-01	10.316	6.913	8.993
1-02	8.039	5.804	6.326	1-02	7.268	5.284	6.424
1-03	7.339	5.010	5.170	1-03	5.183	2.883	4.111
1-04	7.810	6.189	6.645	1-04	5.806	2.819	4.312
2-01	4.601	2.359	2.272	2-01	3.649	2.169	2.485
2-02	5.241	2.698	2.796	2-02	4.825	3.111	3.552
2-03	5.495	3.040	2.876	2-03	5.676	3.672	4.374
2-04	3.465	1.533	1.360	2-04	5.420	3.946	4.537
Media	5.921	3.862	3.952	Media	6.018	3.850	4.849
S	1.638	1.706	1.944	S	2.010	1.551	2.003
DER	28	44	49	DER	33	40	41
50µL:50µL	INTENSIDADES relación m/z			100µL:100µL	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	5.975	5.429	7.376	1-01	5.292	5.327	6.277
1-02	10.957	10.664	12.163	1-02	8.252	7.053	9.854
1-03	13.308	13.708	13.269	1-03	5.022	4.415	4.941
1-04	12.436	11.312	11.916	1-04	15.384	12.120	14.268
2-01	8.049	7.233	9.111	2-01	14.238	12.783	15.915
2-02	9.766	8.052	8.910	2-02	16.536	10.471	17.814
2-03	9.233	6.815	8.340	2-03	14.209	15.776	15.216
2-04	7.512	6.788	7.656	2-04	17.013	14.685	17.159

<b>Media</b>	9.655	8.750	9.843	<b>Media</b>	11.993	10.329	12.681
<b>S</b>	2.498	2.834	2.266	<b>S</b>	4.997	4.287	4.996
<b>DER</b>	26	32	23	<b>DER</b>	42	42	39

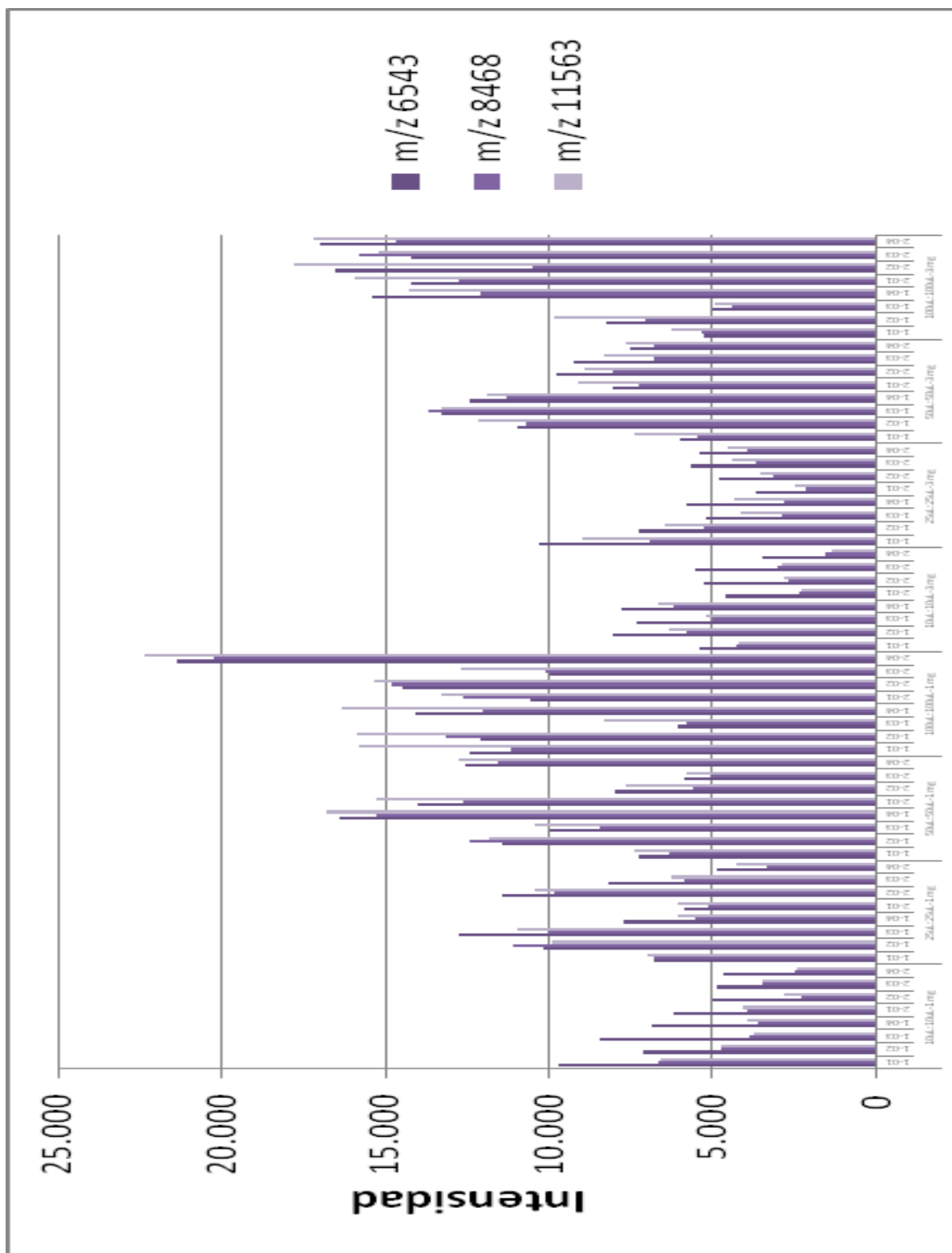


Figura 35. Optimización cantidad de AcF:ACN en la relación 1:1 para 1 y 3 mg de muestra

#### 4.2.1.3.5. Efecto de la forma de adición de la mezcla AcF:ACN sobre la muestra

Los ensayos se han realizado de dos formas diferentes, añadiendo secuencialmente 100  $\mu$ L de AcF y 100  $\mu$ L de ACN, o bien mezclando previamente estos volúmenes de AcF y ACN y depositando los 200  $\mu$ L sobre la muestra. Estos ensayos se han realizado utilizando matriz recientemente preparada (matriz nueva) y transcurridas dos semanas desde su preparación (matriz 2 semanas), tabla 14. Los espectros de masas correspondientes a los análisis realizados se muestran en la figura 36. Se realizaron cuatro medidas por pocillo.

En la representación de estos datos, figura 37, se pone de manifiesto claramente que la intensidad de la señal de los iones es mayor cuando se utiliza matriz nueva y los reactivos AcF y ACN se añaden de forma secuencial, dando lugar al importante efecto del AcF en la ruptura de la pared celular de las levaduras con la consecuente liberación de las proteínas al medio.

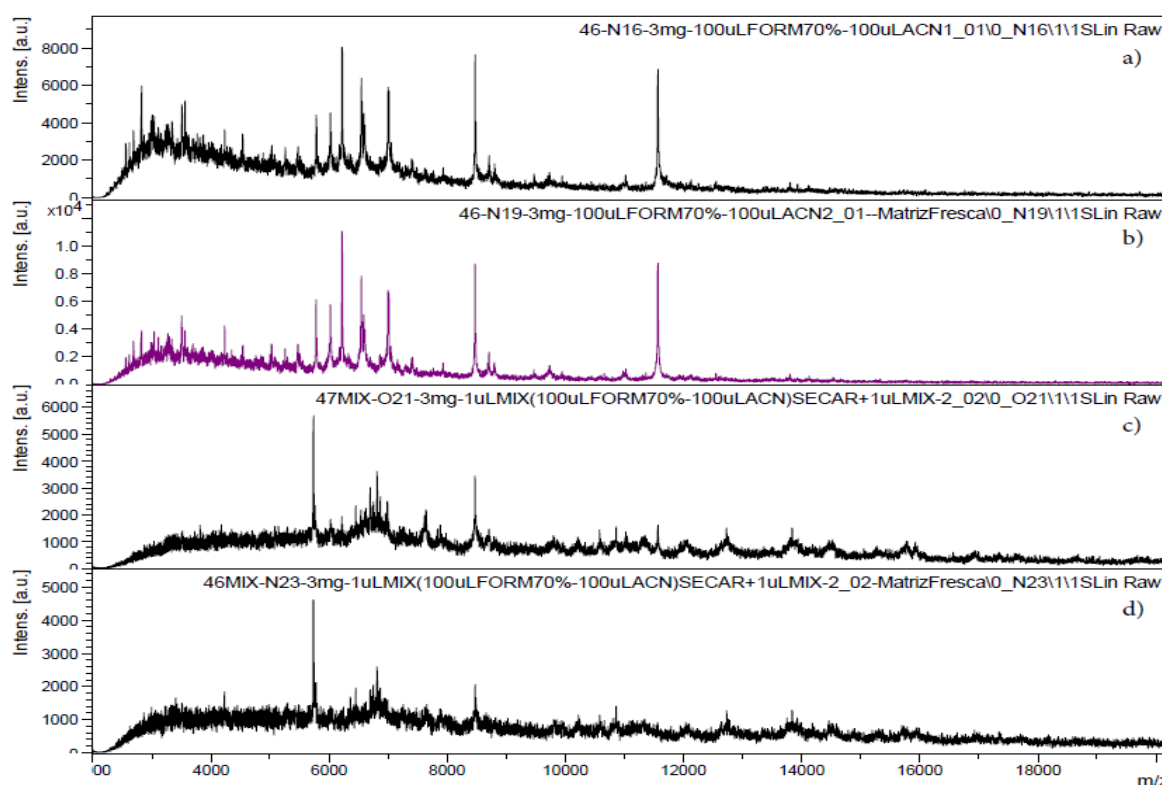


Figura 36. Espectros de masas obtenidos en la optimización de la forma de adición de la mezcla AcF:ACN sobre la muestra, a) Matriz 2-semanas secuencial, b) Matriz nueva secuencial, c) Matriz 2-semanas MIX, d) Matriz nueva MIX

Tabla 14. Optimización de la forma de adición de la mezcla AcF:ACN sobre la muestra

MODO DEPOSITAR MATRIZ-3 mg-100µLAcF(70%):100µLACN (1:1); OS 75%ACN 2,5%TFA; 1µL(secar)+1µLHCCA							
Matriz 2-semanas 100µL:100µL secuencial	INTENSIDADES relación m/z			Matriz nueva 100µL:100µL secuencial	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	6.367	7.653	6.873	1-01	20.526	21.627	21.729
1-02	11.029	14.039	12.039	1-02	29.324	20.714	24.054
1-03	10.014	9.485	9.066	1-03	25.934	26.738	23.948
1-04	15.555	16.326	17.368	1-04	20.179	18.940	23.811
Media	10.741	11.876	11.337	Media	23.991	22.005	23.386
S	3.782	4.001	4.544	S	4.425	3.347	1.109
DER	35	34	40	DER	18	15	5
Matriz 2-semanas 100µL:100µL MIX	INTENSIDADES relación m/z			Matriz nueva 100µL:100µL MIX	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	0	3.957	1.004	1-01	0	2.191	712
1-02	0	4.384	1062	1-02	0	3.255	1.240
1-03	0	3.573	1.411	1-03	0	2.712	1.037
1-04	0	1.920	878	1-04	0	2.570	837
Media	0	3.459	1.089	Media	0	2.682	957
S	0	1.078	228	S	0	441	232
DER	-	31	21	DER	-	16	24

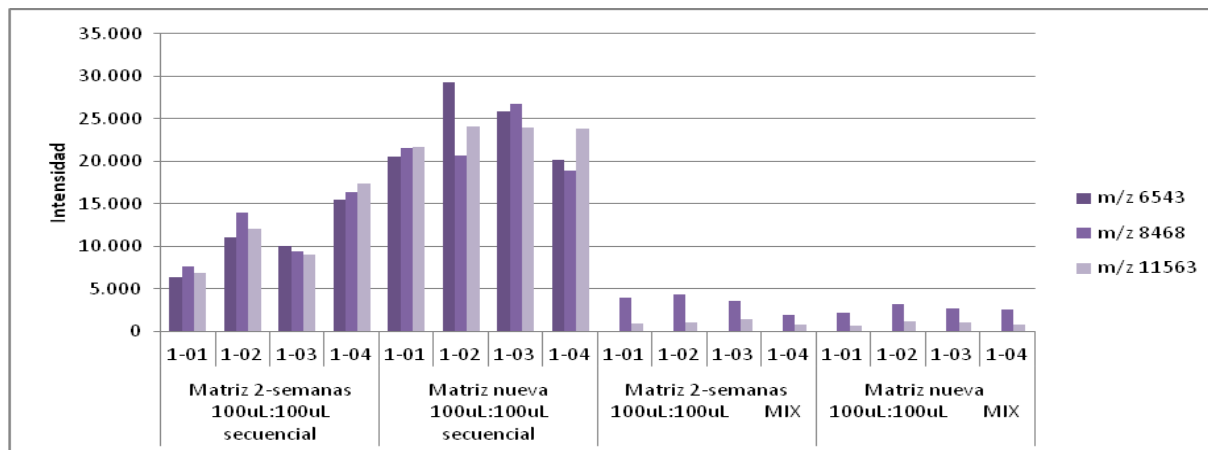


Figura 37. Optimización de la forma de adición de la mezcla AcF:ACN sobre la muestra

#### 4.2.1.4. Estudios sobre la matriz y disolución orgánica (OS)

##### 4.2.1.4.1. Estabilidad de la matriz y OS

Los espectros de masas obtenidos para este estudio se presentan en la figura 38. Los resultados de la tabla 15 y figura 39 parecen indicar que no son concluyentes respecto a la intensidad y precisión. La variabilidad de los resultados no permite tomar la precisión como criterio de selección. Sin embargo, cuando la matriz se prepara recientemente parece que la intensidad es mayor, por lo que se decidió preparar la matriz y OS en el momento de iniciar los análisis pudiéndose conservar ambos durante una semana.

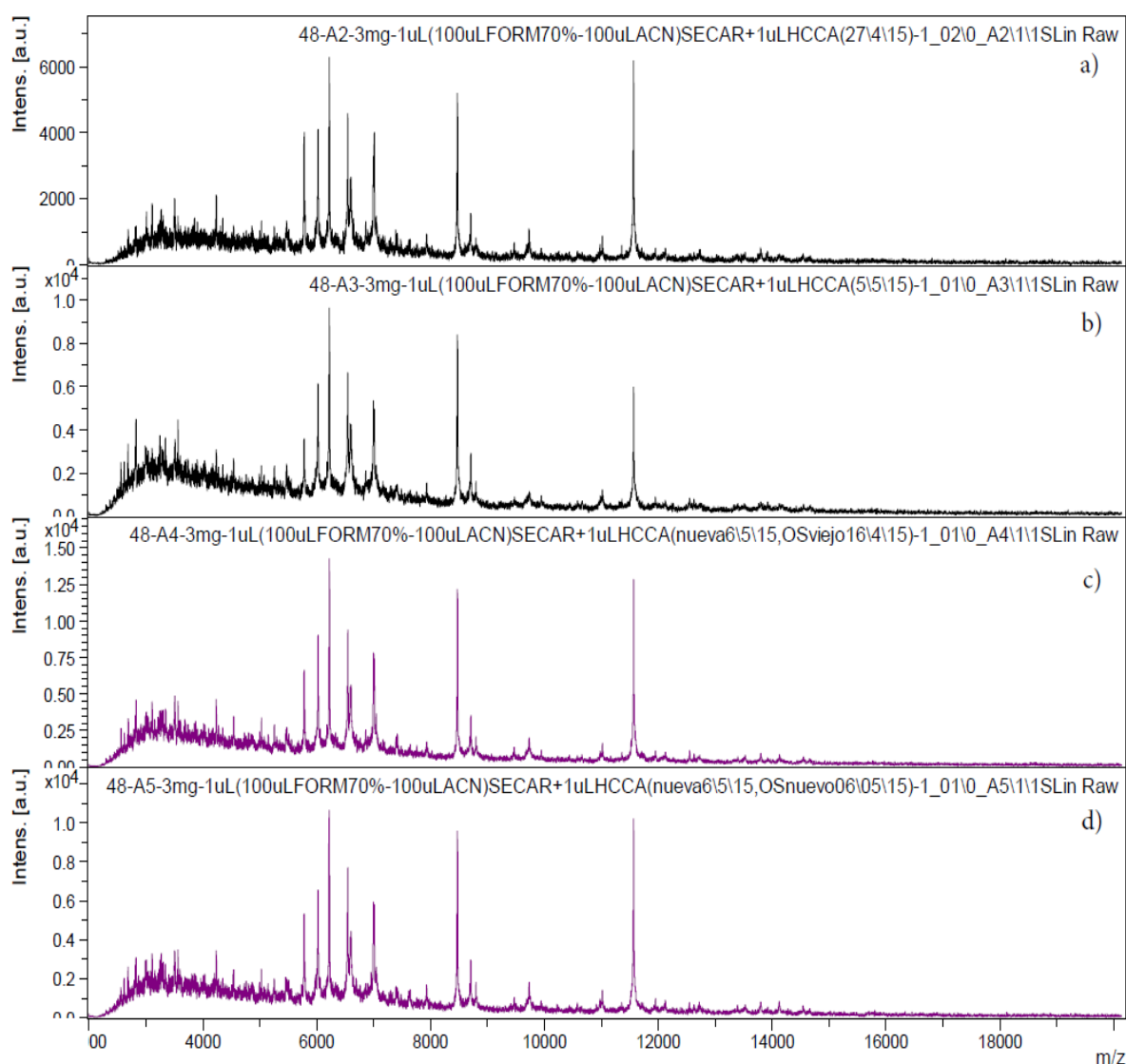


Figura 38. Espectros de masas obtenidos en el estudio de la estabilidad de la matriz y OS, a) Matriz 2sem., b) Matriz 1día, c) Matriz nueva, OS 2sem, d) Matriz nueva, OS nuevo

Tabla 15. Estudio de la estabilidad de la matriz y OS

ESTABILIDAD DE LA MATRIZ Y OS-3 mg-100 $\mu$ LAcF(70%):100 $\mu$ LACN (1:1) OS 75%ACN-2,5%TFA							
Matriz 2sem.	INTENSIDADES relación m/z			Matriz 1día	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	6.995	8.118	7.723	1-01	6.650	7.738	5.983
1-02	4.604	5.211	6.197	1-02	6.953	7.156	6.677
Media	5.800	6.665	6.960	Media	6.802	7.447	6.330
S	1.691	2.056	1.079	S	214	412	491
DER	29	31	16	DER	3	6	8
Matriz nueva OS 2sem.	INTENSIDADES relación m/z			Matriz nueva OS nuevo	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	8.555	12.183	12.569	1-01	7.480	8.996	10.200
1-02	11.725	12.764	11.716	1-02	5.160	5.768	6.158
Media	10.140	12.474	12.143	Media	6.320	7.382	8.179
S	2.242	411	603	S	1.640	2.283	2.858
DER	22	3	5	DER	26	31	35

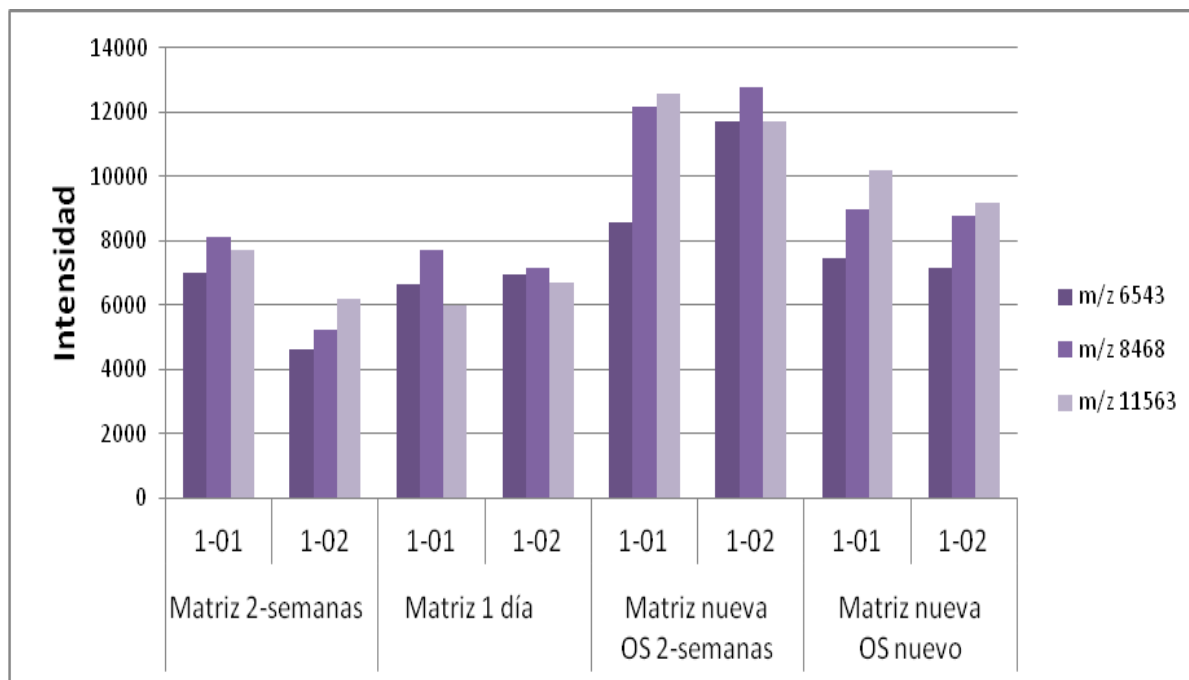


Figura 39. Estudio de la estabilidad de la matriz y OS

#### 4.2.1.4.2. Efecto de la variación del porcentaje de ACN en la disolución OS

Manteniendo constante el porcentaje de TFA a 2,5% en la disolución OS y aumentando el porcentaje de ACN en la disolución desde 25% a 90 % se observa, tabla 16 y figuras 40 y 41, que la intensidad iónica aumenta claramente hasta porcentajes del 75% de ACN, disminuyendo para porcentajes de 80 y 90%.

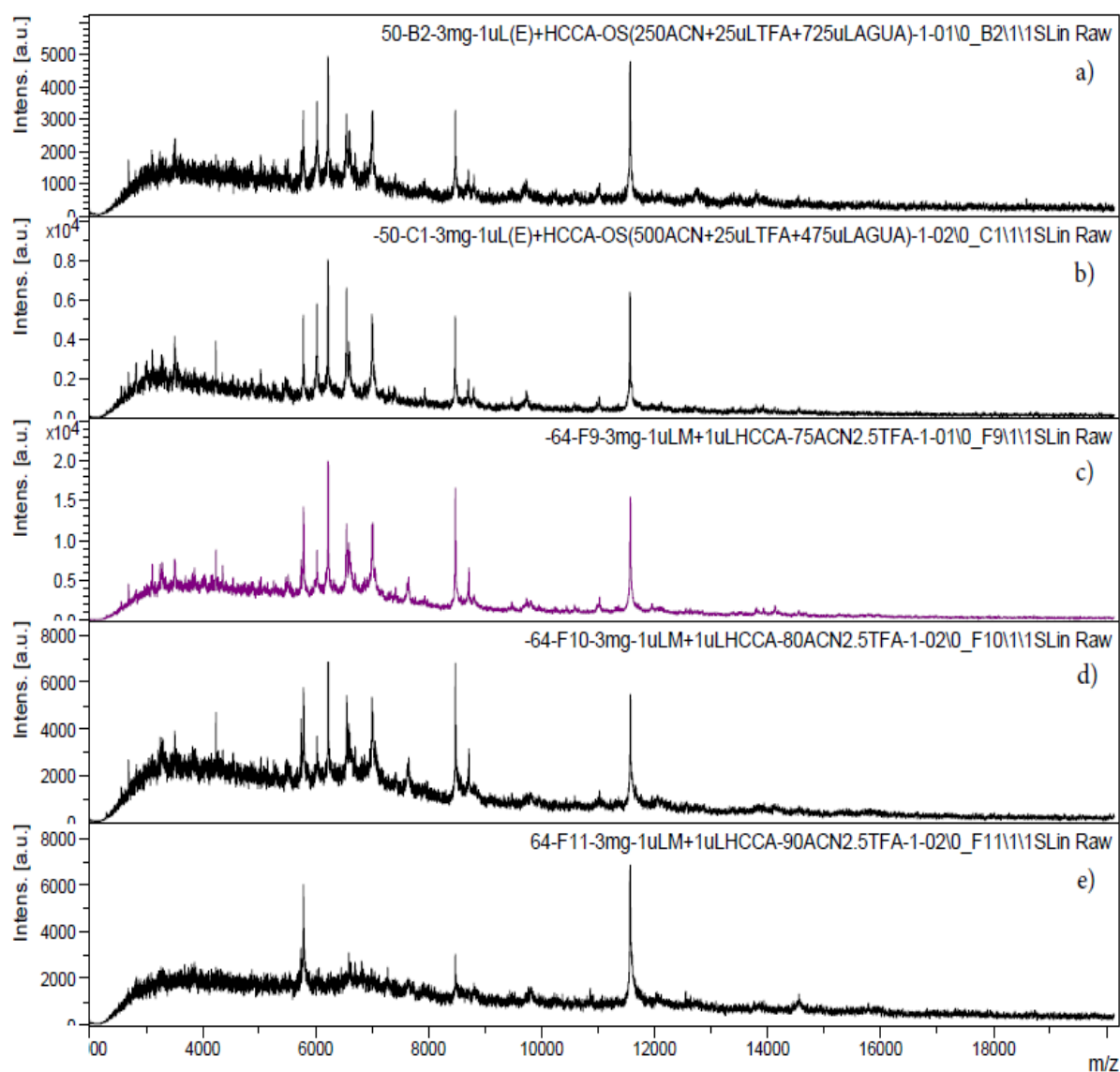


Figura 40. Espectros de masas obtenidos en la optimización del porcentaje de ACN en la disolución OS, a) 25%, b) 50%, c) 75%, d) 80%, e) 90%

Tabla 16. Optimización del porcentaje de ACN en la disolución OS

Efecto % ACN-3 mg-100µLAcF(70%):100µLACN (1:1); OS variable%ACN 2,5%TFA							
25%ACN 2,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z			50%ACN 2,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	2.877	3.456	4.794	1-01	7.761	5.813	8.818
1-02	4.475	6.584	6.485	1-02	8.465	9.394	10.103
1-03	4.109	6.154	6.384	1-03	7.183	9.945	8.394
1-04	4.244	6.154	6.289	1-04	10.465	9.164	11.094
Media	3.926	5.587	5.988	Media	8.469	8.579	9.602
S	716	1.435	800	S	1.431	1.873	1.232
DER	18	26	13	DER	17	22	13
OS 75%ACN 2,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z			OS 80%ACN 2,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	16.695	17.476	16.649	1-01	8.459	10.324	6.860
1-02	15.236	18.444	18.993	1-02	9.480	10.976	12.842
1-03	18.085	19.742	17.273	1-03	7.626	7.891	7.526
1-04	15.613	17.933	18.683	1-04	7.989	8.980	6.981
Media	16.407	18.399	17.900	Media	8.389	9.543	8.552
S	1.278	979	1.120	S	804	1.380	2.874
DER	8	5	6	DER	10	14	34
OS 90%ACN 2,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z						
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563				
1-01	0	0	0				
1-02	0	2.883	6.885				
1-03	0	2.194	6.448				
1-04	0	2.297	10.455				
Media	0	1.844	5.947				
S	0	1.266	4.352				
DER	-	69	73				



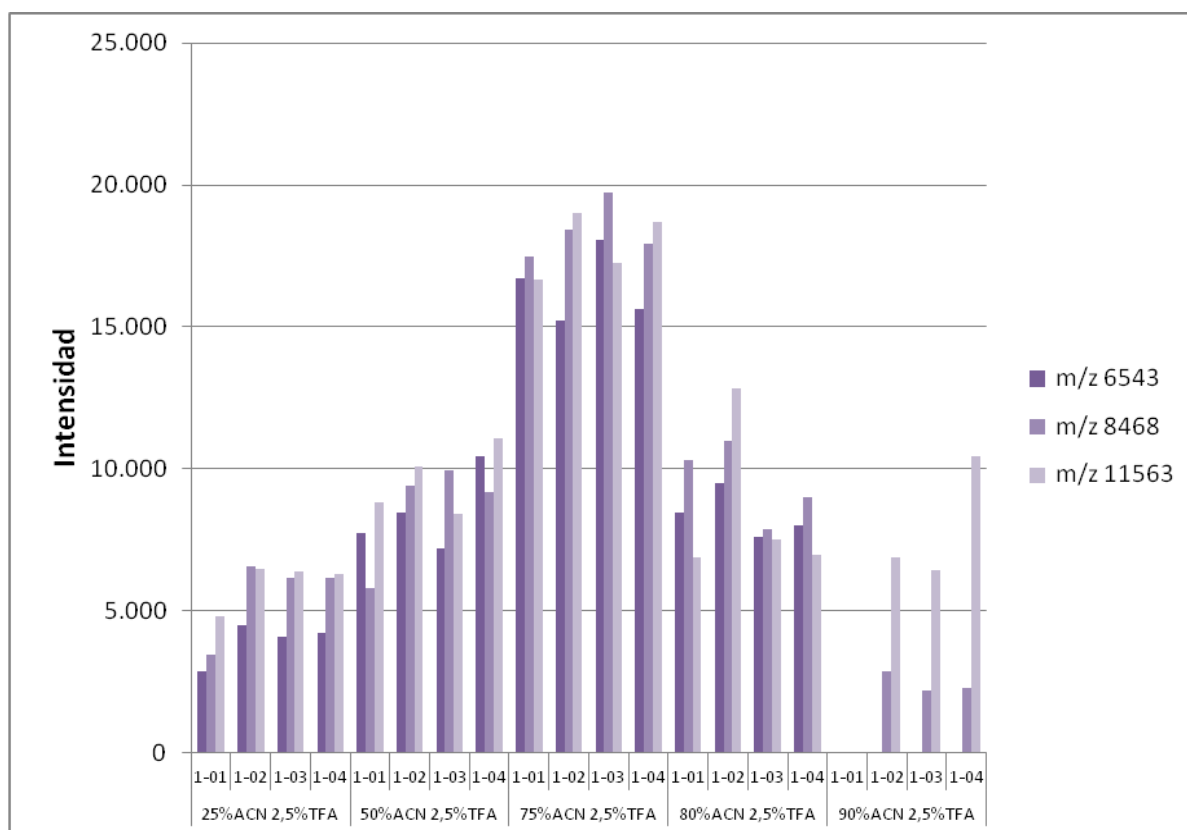


Figura 41. Optimización del porcentaje de ACN en la disolución OS

#### 4.2.1.4.3. Efecto de la variación del porcentaje de TFA en la disolución OS

Un vez elegido el porcentaje de 75% de ACN como el más adecuado en la disolución OS, de forma análoga, se ha estudiado el efecto de la variación del porcentaje de TFA manteniendo constante el de ACN. Como se puede observar en la tabla 17 y en la figura 43, los mejores resultados en cuanto a intensidad se obtienen para la concentración 2,5% de TFA, con DER mínimas. Los espectros de masas obtenidos se muestran en la figura 42.

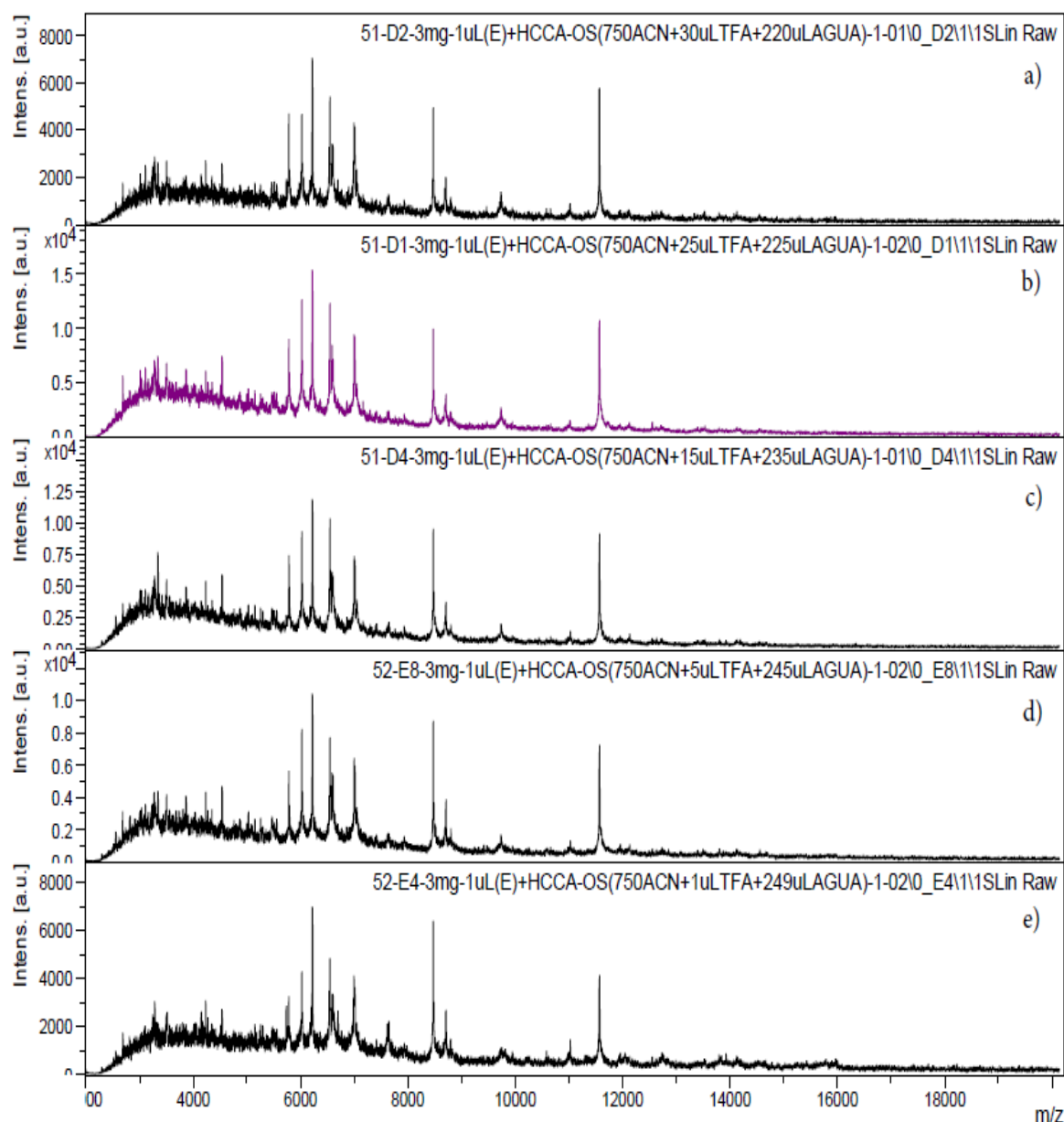


Figura 42. Espectros de masas obtenidos en la optimización del porcentaje de TFA en la disolución OS, a) 3%, b) 2,5%, c) 1,5%, d) 0,5%, e) 0,1%

Tabla 17. Optimización del porcentaje de TFA en la disolución OS

PORCENTAJE de TFA-3 mg-100 $\mu$ LAcF(70%):100 $\mu$ LACN (1:1); OS 75%ACN variable%TFA							
75%ACN 3%TFA	INTENSIDADES relación m/z			75%ACN 2,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	5.225	4.763	5.793	1-01	15.419	13.833	12.849
1-02	8.850	8.734	9.123	1-02	16.549	12.614	12.821
<b>Media</b>	7.038	6.749	7.458	<b>Media</b>	15.984	13.224	12.835
<b>S</b>	2.563	2.808	2.355	<b>S</b>	799	862	20
<b>DER</b>	36	42	32	<b>DER</b>	5	7	0

75%ACN 1,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z			75%ACN 0,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	14.359	11.938	12.079	1-01	10.225	11.373	9.349
1-02	12.509	10.614	10.836	1-02	8.358	11.443	8.920
<b>Media</b>	13.434	11.276	11.458	<b>Media</b>	9.292	11.408	9.135
<b>S</b>	1.308	936	879	<b>S</b>	1.320	49	303
<b>DER</b>	10	8	8	<b>DER</b>	14	0	3

75%ACN 0,1%TFA	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	7.521	6.041	7.002
1-02	4.814	6.402	3.951
<b>Media</b>	6.168	6.222	5.477
<b>S</b>	1.914	255	2.157
<b>DER</b>	31	4	39

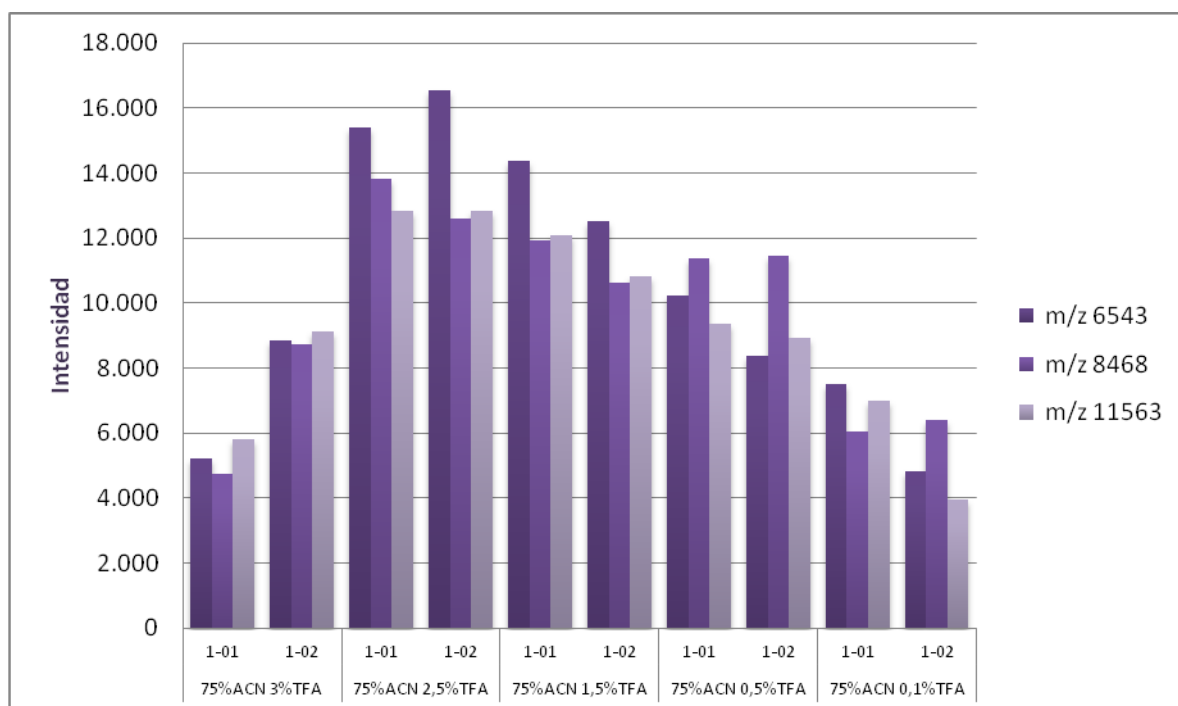


Figura 43. Optimización del porcentaje de TFA en la disolución OS

#### 4.2.1.4.4. Efecto de la variación simultanea del porcentaje de ACN y TFA en la disolución OS

Se ha estudiado el efecto de la variación simultanea de ACN y TFA, para valores de a) 25%ACN-2,5%TFA, b) 50%ACN-2,5%TFA,, c)75%ACN-2,5%TFA, d) 50%ACN-1%TFA y e) 25%ACN-5%TFA (ver figura 44 y 45, así como tabla 18) observándose que aunque se incremente el porcentaje de TFA en la disolución OS, la intensidad de los iones no aumenta si no se aumenta simultáneamente el porcentaje de ACN.

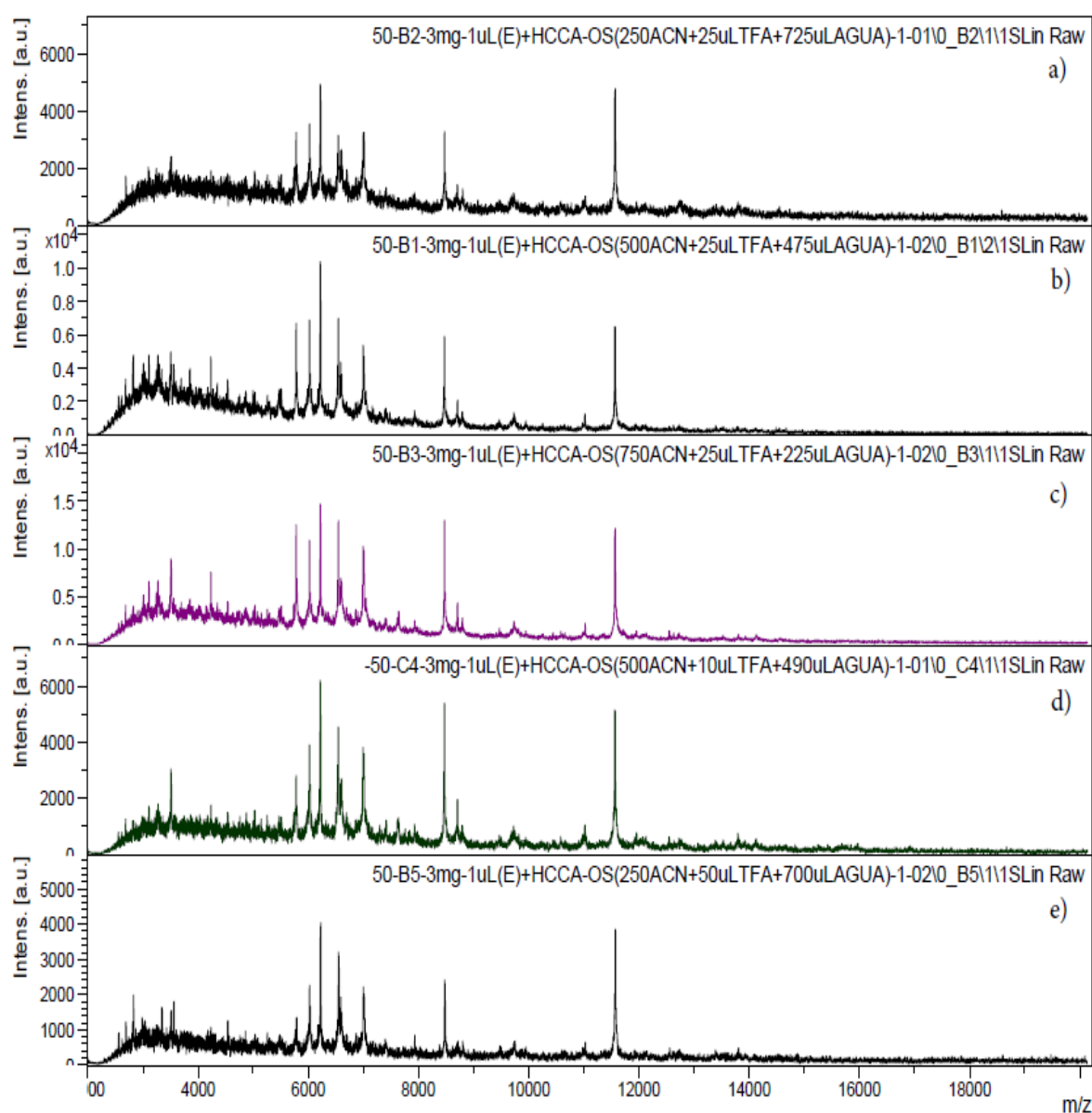


Figura 44. Espectros de masas obtenidos en el estudio de la variación simultanea del porcentaje de ACN y TFA en la disolución OS, a) 25%ACN-2,5%TFA, b) 50%ACN-2,5%TFA,, c)75%ACN-2,5%TFA, d) 50%ACN-1%TFA y e) 25%ACN-5%TFA

Tabla 18. Estudio de la variación simultanea del porcentaje de ACN y TFA en la disolución OS.

PORCENTAJE ACN y TFA-3 mg-100µLAcF(70%):100µLACN (1:1); OS variable%ACN variable%TFA							
25%ACN 2,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z			50%ACN 2,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	2.877	3.940	4.794	1-01	7.761	5.813	8.818
1-02	4.244	6.154	6.289	1-02	10.465	9.164	12.895
Media	3.561	5.047	5.542	Media	9.113	7.488	10.857
S	967	1.566	1.057	S	1.912	2.370	2.883
DER	27	31	19	DER	21	32	27
75%ACN 2,5%TFA	INTENSIDADES relación m/z			50%ACN 1%TFA	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	12.756	12.998	13.987	1-01	4.864	6.628	6.856
1-02	12.446	12.890	12.186	1-02	4.594	6.443	5.771
Media	12.601	12.944	13.087	Media	4.729	6.536	6.314
S	219	76	1.273	S	191	131	767
DER	2	1	10	DER	4	2	12
25%ACN 5%TFA	INTENSIDADES relación m/z						
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563				
1-01	4.537	2.334	3.046				
1-02	2.995	2.293	3.865				
Media	3.766	2.314	3.456				
S	1.090	29	579				
DER	29	1	17				

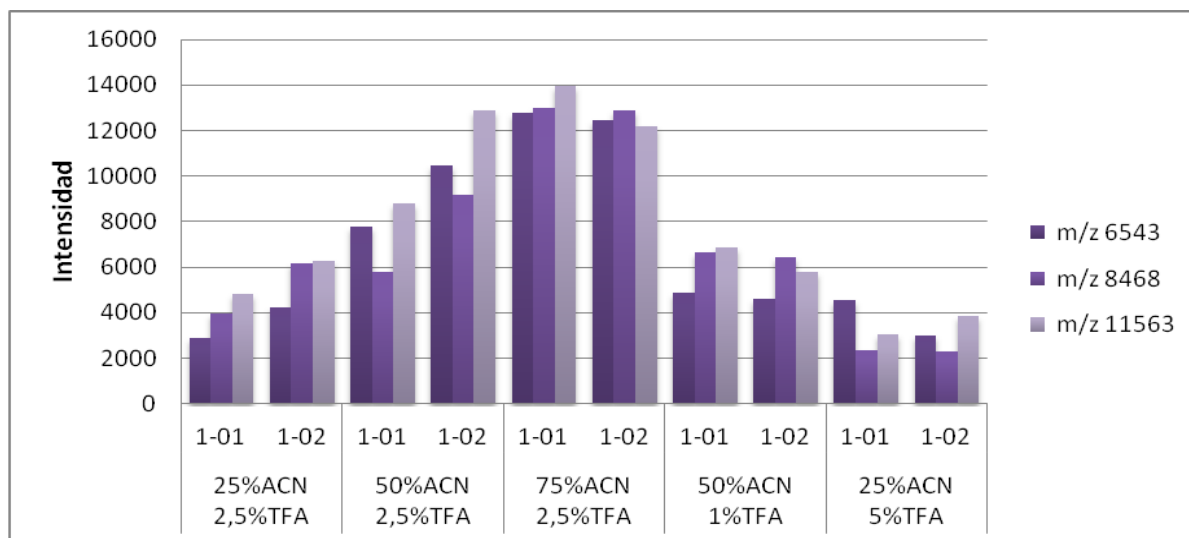


Figura 45. Estudio de la variación simultanea del porcentaje de ACN y TFA en la disolución OS

#### 4.2.1.4.5. Efecto de la dilución y cantidad de matriz

Teniendo en cuenta que la concentración de la matriz puede ejercer un efecto importante sobre los espectros de masas MALDI-TOF MS, se empleó la matriz en su concentración usual (10 mg/mL) y con dilución 1:10. En otro experimento, además de esta dilución de la matriz, se ha añadido sobre la muestra el doble de volumen de matriz, es decir, 2  $\mu$ L en vez de 1  $\mu$ L.

De acuerdo con los resultados de la tabla 19 y figuras 46 y 47, se puede observar que los mejores resultados se obtienen cuando se utiliza la matriz sin diluir, en cuanto que se obtienen mayores intensidades y mayor precisión. Con respecto a la diferencia de volumen añadido de la matriz diluida, se observa que son mayores las intensidades de los iones y las DER obtenidos al depositar 2  $\mu$ L de matriz que depositando 1  $\mu$ L.

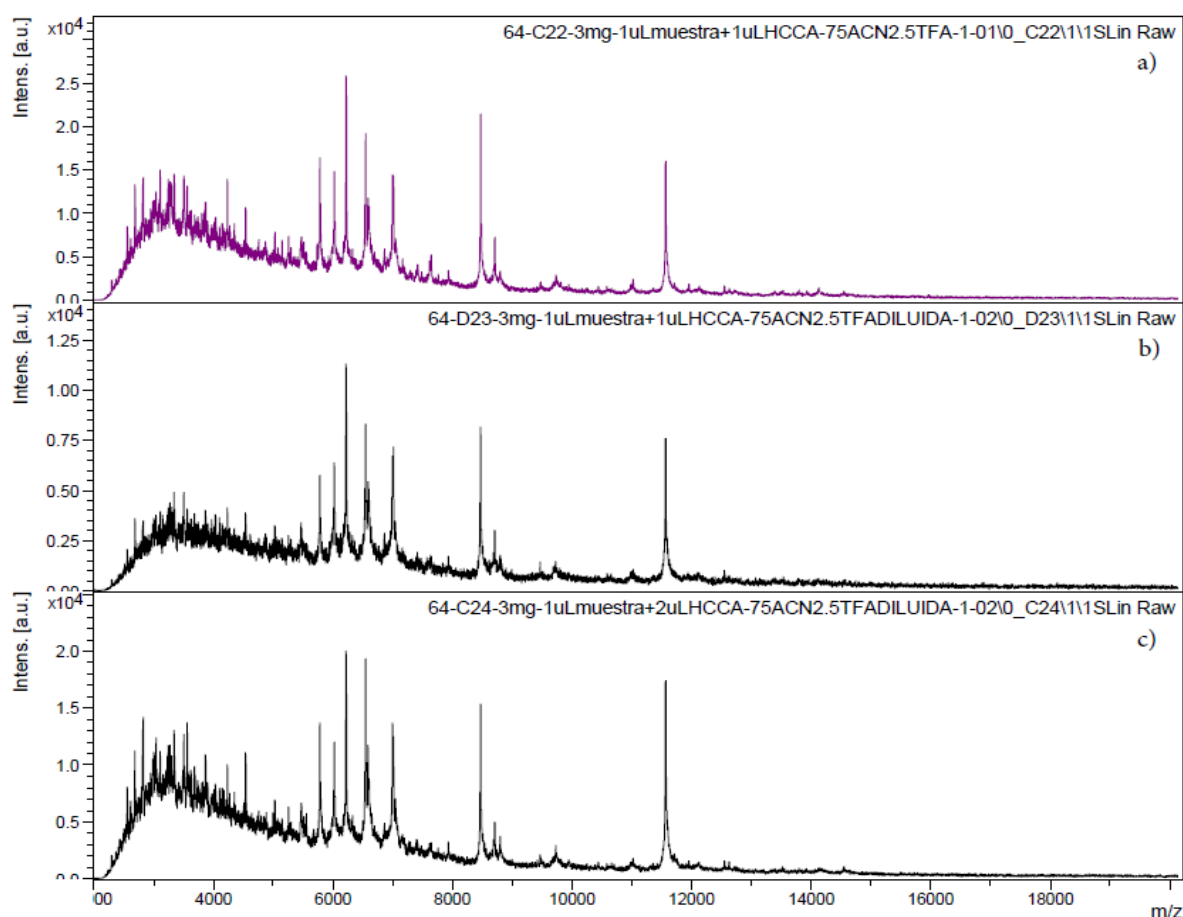


Figura 46. Espectros de masas obtenidos en el estudio de la dilución de la matriz, a) sin dilución de matriz, b) 1  $\mu$ L matriz diluida, c) 2  $\mu$ L matriz diluida

Tabla 19. Estudio de la dilución de la matriz

EFECTO DILUCION MATRIZ-MATRIZ-3 mg-100µLAcF(70%):100µLACN (1:1); OS 75%ACN 2,5%TFA							
1µL(secar)+1µLHCCA A	INTENSIDADES relación m/z			1µL(secar) + 1µLHCCA Dil.	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	18.686	16.176	17.294	1-01	11.061	11.233	10.330
1-02	17.520	16.813	17.575	1-02	12.410	10.701	11.586
1-03	22.837	18.862	17.614	1-03	4.648	4.715	4.899
1-04	24.363	18.606	18.227	1-04	4.697	4.326	4.739
Media	20.852	17.614	17.678	Media	8.204	7.744	7.889
S	3.269	1.323	393	S	4.115	3.732	3.582
DER	16	8	2	DER	50	48	45
1µL(secar)+ 2µLHCCA Dil.	INTENSIDADES relación m/z						
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563				
1-01	14.299	18.923	14.877				
1-02	16.820	17.453	16.321				
1-03	14.284	11.521	11.300				
1-04	16.715	14.425	11.819				
Media	15.530	15.581	13.579				
S	1.430	3.291	2.415				
DER	9	21	18				

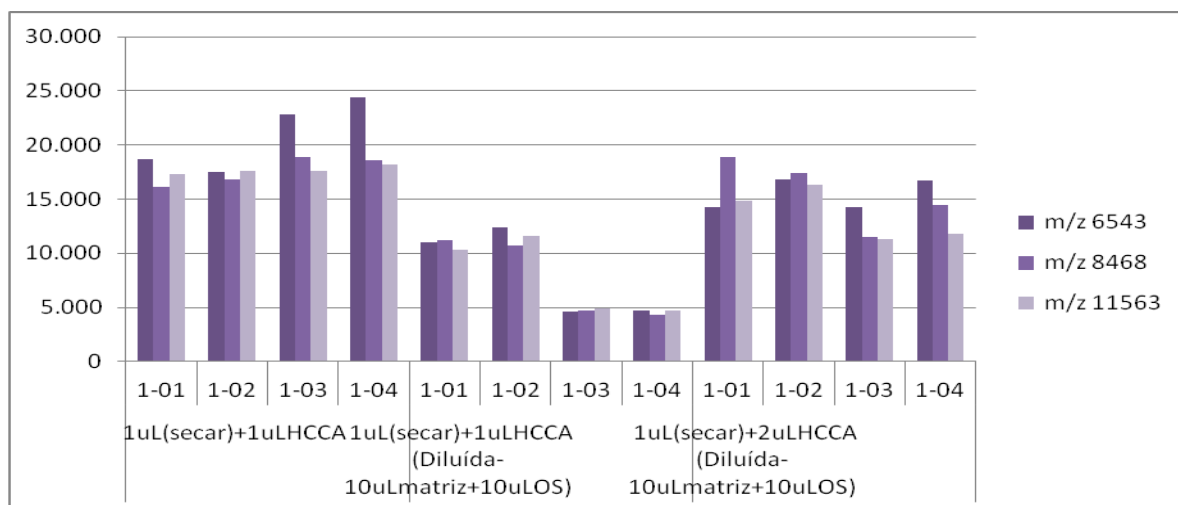


Figura 47. Estudio de la dilución de la matriz

#### 4.2.1.4.6. Volúmenes de muestra y matriz añadidos

Se han estudiado tres combinaciones de volumen muestra-matriz; 2uL de muestra-1uL de matriz, 1uL de muestra-1uL de matriz y 2uL de muestra-2uL de matriz. Los espectros de masas para estas tres combinaciones se presentan en la figura 48; se puede observar que para la combinación 2uL de muestra-1uL de matriz la intensidad iónica es máxima.

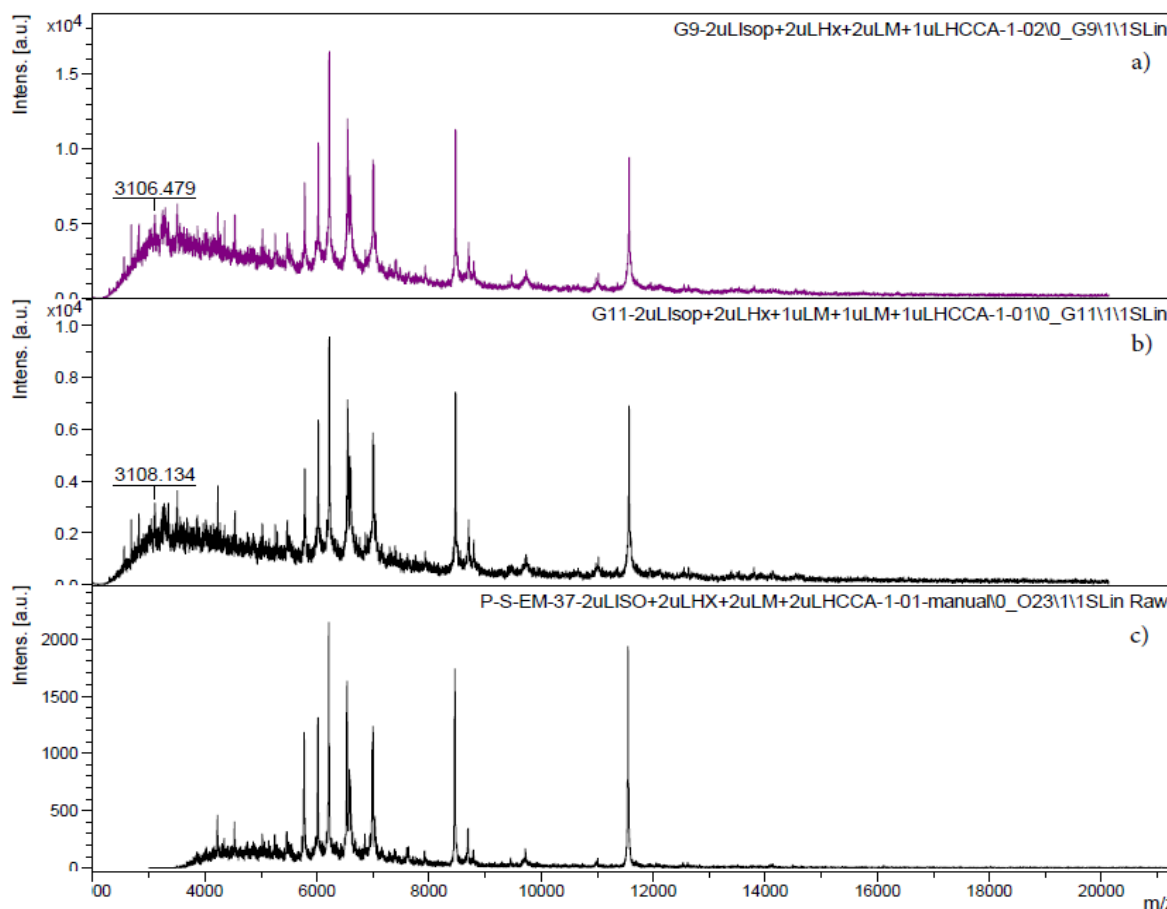


Figura 48. Espectros de masas obtenidos en el estudio del diferentes volúmenes de muestra-matriz, a) 2uL de muestra-1uL de matriz, b)1uL de muestra-1uL de matriz, c) 2uL de muestra-2uL de matriz

#### 4.2.1.4.7. Efecto sándwich matriz-muestra-matriz

Además de la forma usual, de depositar primero la muestra (1  $\mu$ L) y después la matriz (1  $\mu$ L) sobre la placa MALDI, se ha realizado una adición en modo sándwich, matriz (0.5  $\mu$ L)-muestra (1  $\mu$ L)-matriz (0.5  $\mu$ L). Los resultados de la tabla 20 están representados en la figura 50 y muestran que la secuencia de adición clásica produce mejores resultados en términos de intensidad y precisión de los iones. Los espectros de masas obtenidos se presentan en la



figura 49. En este ensayo además de estudiar el modo de depositar muestra-matriz, se ha verificado de nuevo el tipo de placa MALDI y el porcentaje de ACN, a 50 y 75% siendo la placa tipo Anchorchip la más adecuada debido a que se obtienen mayores intensidades iónicas. Por lo que se refiere al porcentaje de ACN, los resultados no fueron concluyentes en estos ensayos ya que son muy similares para ambos porcentajes siempre que se utilice el mismo tipo de placa o modo de adición.

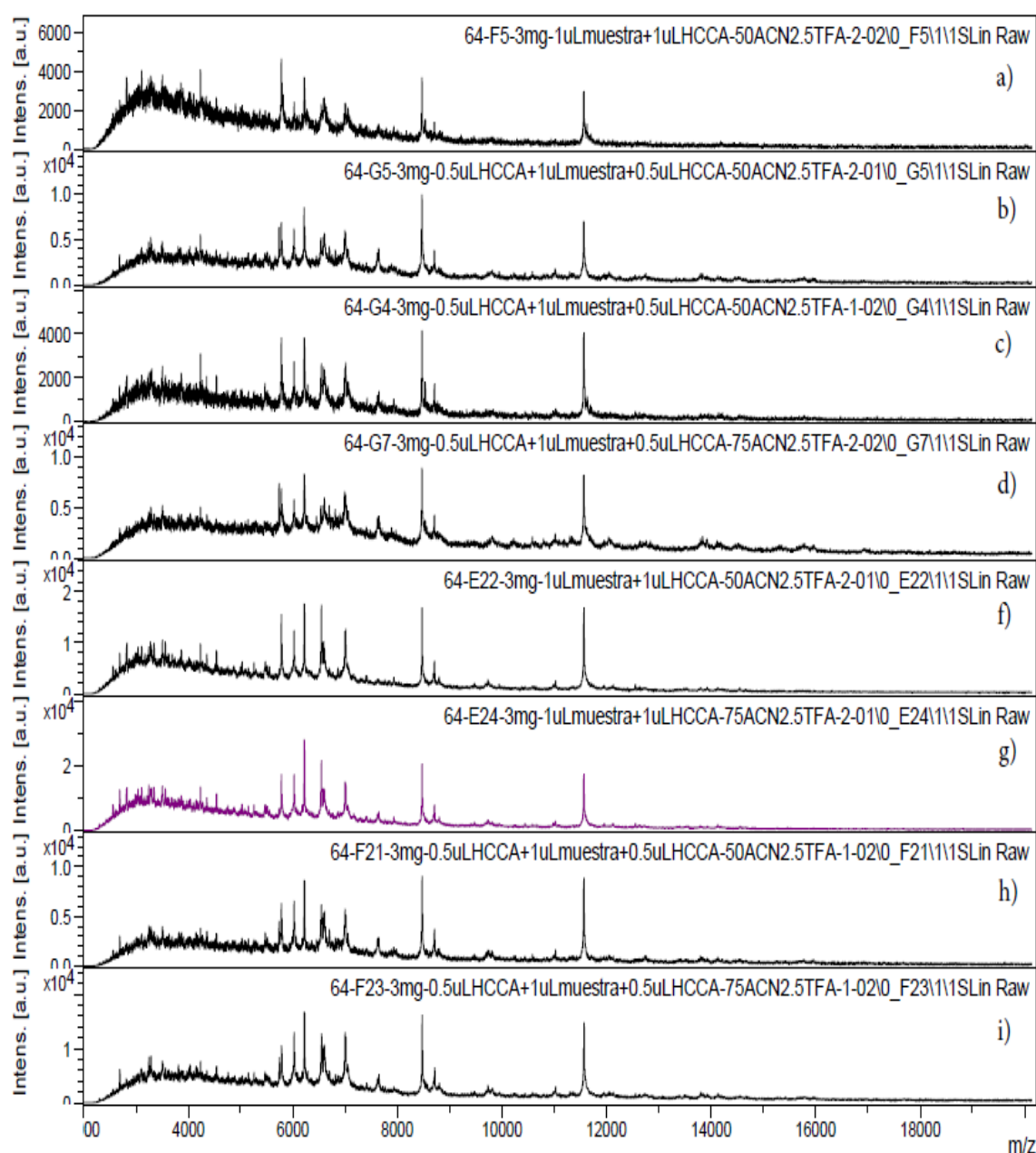


Figura 49. Espectros de masas obtenidos en el estudio del efecto sándwich matriz-muestra-matriz, a) Normal.50%ACN; Placa 384, b) Normal.75%ACN; Placa 384, c) Sandw.50%ACN; Placa 384, d) Sand.75%ACN; Placa 384, f) Normal.50%ACN; PAC., g) Normal.75%ACN; PAC., h) Sandw.50%ACN; PAC., i) Sandw.75%ACN; PAC

Tabla 20. Estudio del efecto sándwich matriz-muestra-matriz

EFECTO SANDWICH MUESTRA-MATRIZ-3 mg-100µLAcF(70%):100µLACN (1:1); OS variable%ACN 2,5%TFA							
Normal.50%; Placa 384	INTENSIDADES relación m/z			Normal.75%; Placa 384	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	2.800	4.463	3.450	1-01	2.093	1.964	1.668
1-02	2.990	5.020	3.808	1-02	3.626	5.168	5.595
1-03	3.035	4.757	3.641	1-03	2.752	3.562	3.079
1-04	2.286	3.667	2.770	1-04	2.425	3.113	2.509
Media	2.778	4.477	3.417	Media	2.724	3.452	3.213
S	343	586	456	S	659	1.327	1.691
DER	12	13	13	DER	2.418	3.846	5.262
Sandw.50%; Placa 384	INTENSIDADES relación m/z			Sand.75%; Placa 384	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	5.652	8.030	6.977	1-01	2.369	2.485	1.497
1-02	2.434	4.151	4.058	1-02	2.646	3.294	2.200
1-03	4.848	9.155	6.917	1-03	4.213	6.847	4.330
1-04	4.542	9.390	7.740	1-04	4.868	8.580	8.172
Media	4.369	7.682	6.423	Media	3.524	5.302	4.050
S	1.372	2.427	1.621	S	1.209	2.893	3.001
DER	31	32	25	DER	3.431	5.456	7.409
Normal.50%; PAC	INTENSIDADES relación m/z			Normal.75%; PAC	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	12.555	15.478	14.945	1-01	5.488	4.701	4.555
1-02	12.502	13.476	13.163	1-02	9.606	13.469	11.079
1-03	17.467	16.793	16.977	1-03	21.067	20.211	17.508
1-04	15.206	14.722	16.520	1-04	18.879	21.167	17.741
Media	14.433	15.117	15.401	Media	13.760	14.887	12.721
S	2.385	1.389	1.727	S	7.422	7.606	6.258
DER	17	9	11	DER	54	51	49
Sandw.50%; PAC	INTENSIDADES relación m/z			Sandw.75%; PAC	INTENSIDADES relación m/z		

Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	9.152	12.509	8.588	1-01	3.599	6.523	6.246
1-02	5.651	8.825	8.876	1-02	8.759	9.222	9.074
1-03	4.939	6.322	7.048	1-03	6.364	6.633	5.089
1-04	3.868	6.383	8.921	1-04	7.274	7.020	8.088
<b>Media</b>	<b>5.903</b>	<b>8.510</b>	<b>8.358</b>	<b>Media</b>	<b>7.499</b>	<b>9.100</b>	<b>8.374</b>
<b>S</b>	<b>2.287</b>	<b>2.910</b>	<b>886</b>	<b>S</b>	<b>3.839</b>	<b>4.753</b>	<b>3.995</b>
<b>DER</b>	<b>39</b>	<b>34</b>	<b>11</b>	<b>DER</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>48</b>

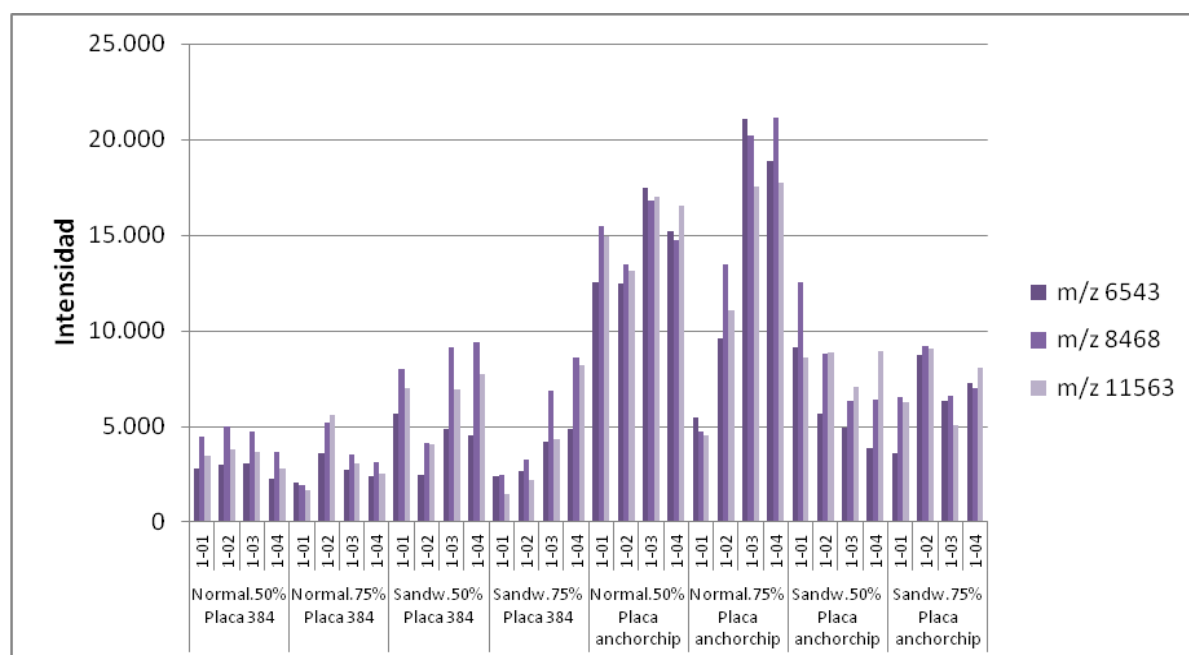


Figura 50. Estudio del efecto sándwich matriz-muestra-matriz

#### 4.2.1.4.8. Efecto del modo de depositar muestra-matriz

Se han ensayado tres formas de depositar el conjunto muestra-matriz sobre la placa MALDI, con el objetivo de conseguir una máxima homogeneidad de la mezcla; a) deposición de la muestra y tras secado deposición de la matriz, b) deposición de la muestra, secado, deposición de la matriz, y previo al secado completo se agitó mediante succiones sucesivas con la punta de la micropipeta, c) mezclado de muestra y matriz con posterior deposición sobre la placa MALDI. Los mejores resultados se obtuvieron en el caso a), tal y como se observa en la figura 51; además, la precisión de las intensidades es mayor en este caso (tabla 21, figura 52). En los casos b) y c) se obtienen claramente intensidades inferiores para los iones representativos (obsérvese la diferencia de escala en el eje de ordenadas).

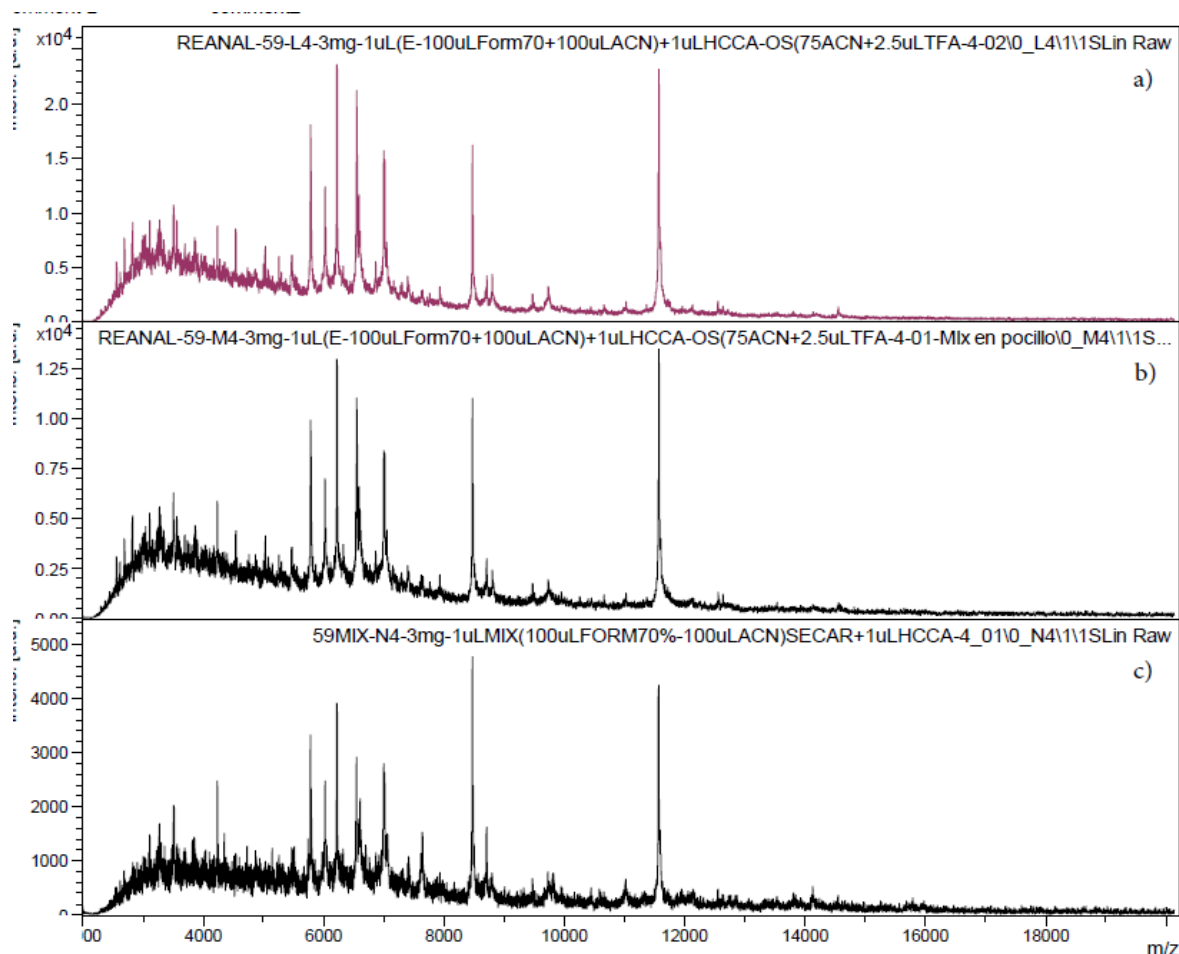


Figura 51. Espectros de masas obtenidos en el estudio del efecto en el modo de depositar muestra-matriz, a) 1 $\mu$ L Muestra-secar+1 $\mu$ LHCCA, b) 1 $\mu$ L Muestra-secar+1 $\mu$ LHCCA (Agitar con punta la matriz en el pocillo), c) MIX-secar+1 $\mu$ LHCCA

Tabla 21. Estudio del efecto en el modo de depositar muestra-matriz

EFECTO MODO DEPOSITAR MATRIZ-3 mg-100 $\mu$ LAcF(70%):100 $\mu$ LACN (1:1); OS 75%ACN 2,5%TFA							
1 $\mu$ L Muestra-secar+1 $\mu$ LHCCA	INTENSIDADES relación m/z			1 $\mu$ L Muestra-secar+1 $\mu$ LHCCA(Agitar con punta la matriz en el pocillo)	INTENSIDADES relación m/z		
Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563	Ensayo	m/z 6543	m/z 8468	m/z 11563
1-01	15.733	16.377	15.528	1-01	12.082	11.321	13.578
1-02	17.587	17.008	17.727	1-02	8.836	7.908	8.123
2-01	17.919	15.997	20.663	2-01	13.207	13.487	15.357
2-02	16.317	17.470	16.630	2-02	16.564	15.592	16.081
3-01	17.165	16.407	17.369	3-01	17.118	18.193	17.452
3-02	15.953	15.822	14.901	3-02	9.418	10.680	8.883
4-01	17.623	13.249	17.894	4-01	11.044	11.040	13.506
4-02	21.122	16.217	23.170	4-02	7.388	9.093	9.784

<b>Media</b>	17.427	16.068	17.985	<b>Media</b>	11.957	12.164	12.846
<b>S</b>	1.703	1.259	2.723	<b>S</b>	3.532	3.414	3.512
<b>DER</b>	10	8	15	<b>DER</b>	30	28	27
<b>MIX-secar+1<math>\mu</math>LHCCA</b>	<b>INTENSIDADES relación m/z</b>						
<b>Ensayo</b>	<b>m/z 6543</b>	<b>m/z 8468</b>	<b>m/z 11563</b>				
1-01	8.605	12.801	10.482				
1-02	6.383	7.643	6.579				
2-01	4.177	8.398	8.189				
2-02	8.023	9.998	10.042				
3-01	7.466	8.903	6.109				
3-02	9.580	11.747	10.182				
4-01	2.685	4.773	4.249				
4-02	9.000	10.308	10.567				
<b>Media</b>	6.990	9.821	8.550				
<b>S</b>	2.434	3.067	2.758				
<b>DER</b>	35	31	32				

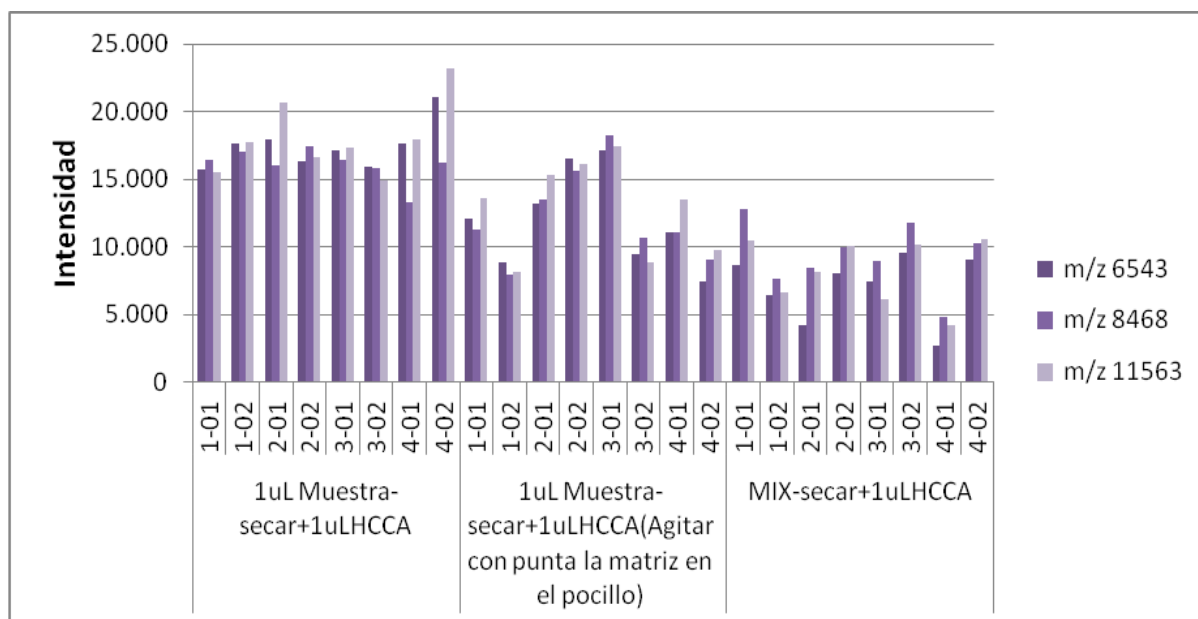


Figura 52. Estudio del efecto en el modo de depositar muestra-matriz

#### 4.2.1.4.9. Estudios al microscopio

La variabilidad de respuesta en MALDI-TOF MS puede atribuirse en último término a la distribución y morfología de los cristales obtenidos tras el secado de la mezcla muestra-matriz en el pocillo; esta morfología es forzosamente dependiente de la tensión superficial

de la mezcla muestra-matriz antes y después del secado. Por esta razón, se han realizado estudios al microscopio que dispone de una ampliación de 200x.

En un tipo de experimento se ha estudiado el efecto de la adición sobre el pocillo de la placa MALDI de 2  $\mu\text{L}$  de isopropanol y 2  $\mu\text{L}$  de hexano previamente a la deposición de muestra y matriz. De acuerdo con la figura 53, la adición de estos dos disolventes produce una mayor homogeneidad de la muestra al mismo tiempo que desplaza parcialmente la matriz hacia los bordes de la gota; aparentemente, la presencia de estos disolventes da lugar a una película de muestra-matriz más fina que en ausencia de los mismos. La falta de homogeneidad del conjunto muestra-matriz en ausencia de estos disolventes se pone de manifiesto claramente en las figuras 54 y 55. En consecuencia, el isopropanol y el hexano afectan positivamente a efecto de la tensión superficial del conjunto de la gota, traduciéndose en una morfología más adecuada; esto se pone de manifiesto en una mayor intensidad de los iones representativos en los espectros de masas.

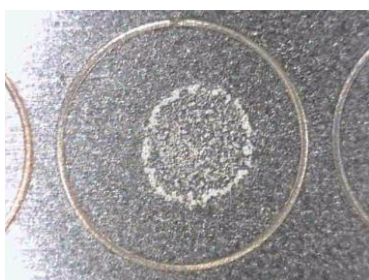


Figura 53. Vista al microscopio de un pocillo con adición previa de disolvente (isopropanol y hexano) sobre muestra-matriz



Figura 54. Vista al microscopio de un pocillo con muestra-matriz en ausencia de disolvente (isopropanol y hexano)-ejemplo1



Figura 55. Vista al microscopio de un pocillo con muestra-matriz en ausencia de disolvente (isopropanol y hexano)-ejemplo2



En otro tipo de experimentos se ha añadido una gota de agua pura, conteniendo distintos porcentajes de ACN (25-50-70-75-100%), sobre el depósito seco muestra-matriz. Las fotografías de los pocillos obtenidas mediante el microscopio muestran el aspecto de la co-cristalización muestra-matriz en los diferentes ensayos. Se puede observar que cuando sobre el pocillo se adiciona solamente la muestra, ésta apenas se visualiza en el pocillo (figura 56); tras la adición de la matriz y 1  $\mu\text{L}$  de ACN al 100% (figura 58), la muestra se concentra en el centro de pocillo y para porcentajes intermedios la focalización de la muestra es aparentemente menor, presentando un aspecto más homogéneo cuando la gota no contiene ACN, es decir, es 100% agua (figura 59) o cuando no se añade la gota de agua (figura 57). Los espectros de masas obtenidos en estos experimentos se presentan en la figura 60. De forma correspondiente con estas observaciones los iones en estos espectros presentan máxima intensidad en ausencia de ACN.



Figura 56. Vista al microscopio de un pocillo con muestra (en ausencia de matriz)



Figura 58. Vista al microscopio de un pocillo muestra-matriz con adición posterior de gota 100% ACN



Figura 57 Vista al microscopio de un pocillo muestra-matriz sin adición posterior de gota



Figura 59. Vista al microscopio de un pocillo muestra-matriz con adición posterior de gota 100% agua

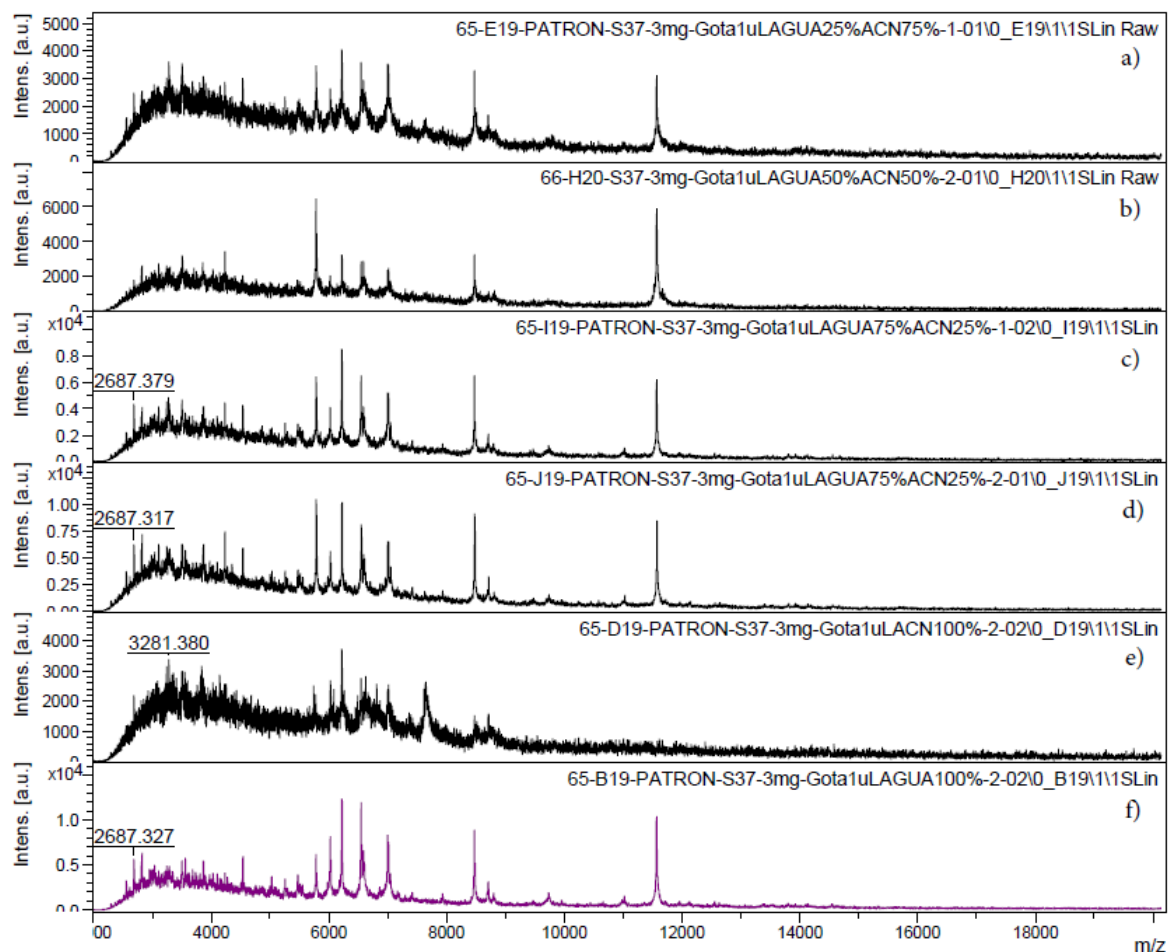


Figura 60. Espectros de masas obtenidos en el estudio del efecto de la adición/no adición al conjunto muestra-matriz de una gota de diferente composición, a) 75%ACN, b) 50%ACN, c) 25%ACN, e) 100%ACN, f) 100% agua.

#### 4.2.1.4.10. Desarrollo del procedimiento propuesto MALDI-TOF

##### MS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los apartados anteriores de optimización, y utilizando los valores o variables seleccionadas de la tabla 9 se ha propuesto el procedimiento especificado en el apartado 3.4.2.2. de la parte experimental.

Aplicando este procedimiento se obtienen espectros de masas del tipo a los que se presentan en los Anexos I y II.

A título de ejemplo, cuando se modifican parámetros del método analítico por ejemplo aumentando el tiempo del pulso de extracción iónica (330 ns), disminuyendo el potencial de



las lentes iónicas (6.00 kV) y disminuyendo la ganancia electrónica del detector se obtienen resultados menos satisfactorios en términos de intensidad; ver los espectros de la figura 61.

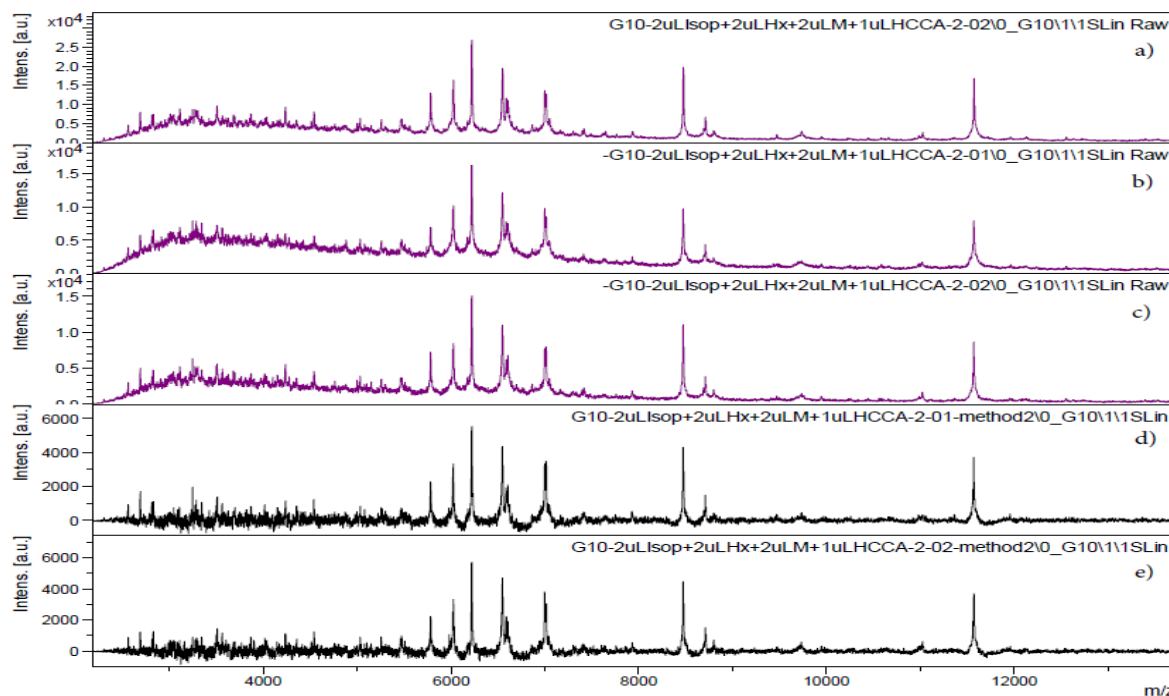


Figura 61. Espectros obtenidos en la modificación de parámetros del método instrumental a), b) y c) no modificados, d) y e) modificados

#### 4.2.2. Creación de librería de espectros de masas de cepas vínicas mediante análisis por MALDI-TOF MS

##### 4.2.2.1. Análisis de cepas del género *Saccharomyces*, especie *S. cerevisiae*. Diferenciación a nivel de cepa.

Se realiza aplicando el procedimiento especificado en el apartado 3.4.2 de la Parte experimental, entre los puntos 3.4.2.1 y 3.4.2.8. Se han analizado 98 cepas (ver tabla 5 en el apartado 3.2.1.1. del Capítulo 3. Parte experimental) identificadas previamente como *S. cerevisiae* mediante técnicas clásicas y moleculares procedentes de las bodegas Emilio Moro, Ossian y Gordonzello durante las vendimias de los años 2011, 2012, 2013 y 2014, todas ellas con polimorfismos de la región interdelta diferentes.

Utilizando el programa estadístico R se han comparado algunas cepas, elegidas tomando una cepa de cada finca de cada una de las bodegas en estudio, con el resto de las

cepas de la librería para ver el porcentaje de similitud existente entre ellas; se ha comprobado que las cepas tienen en todos los casos un porcentaje de similitud consigo mismas del 100%.

Los espectros de masas de las cepas de *Saccharomyces* analizadas se presentan en el Anexo I. De la tabla 22 a la 42 se presentan los resultados de las cepas identificadas como *S. cerevisiae* y los porcentajes de similitud de las nueve primeras candidatas.

Tabla 22. Identificación de la cepa S-EM-314 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-LS-314</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-EM-LS-322</b>	86,83	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-181</b>	82,96	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-106</b>	82,47	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-311</b>	82,10	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-302</b>	80,67	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-316</b>	80,19	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-335</b>	79,81	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-289</b>	79,54	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 23. Identificación de la cepa S-G-37 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-G-37</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-EM-PR-360</b>	94,97	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-113</b>	94,64	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-286</b>	94,42	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-368</b>	92,97	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-250</b>	92,66	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-40</b>	92,55	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	92,06	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-9</b>	92,02	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 24. Identificación de la cepa S-G-45 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-G-45</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-EM-MA-181</b>	83,42	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-349</b>	77,56	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-258</b>	73,73	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-261</b>	72,22	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-30</b>	69,70	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-314</b>	69,27	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-345</b>	69,11	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-HO-125</b>	68,41	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 25. Identificación de la cepa S-G-5 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-G-5</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-EM-CV-258</b>	86,04	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-6</b>	85,61	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-113</b>	85,51	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-89</b>	85,37	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-31</b>	85,11	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-15</b>	84,39	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	83,00	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-368</b>	82,10	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 26. Identificación de la cepa S-G-89 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-G-89</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-G-9</b>	95,51	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-113</b>	91,74	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-360</b>	91,14	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-6</b>	90,36	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-57</b>	90,06	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-115</b>	88,77	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-91</b>	88,74	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	88,29	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 27. Identificación de la cepa S-G-113 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-G-113</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-G-9</b>	95,84	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	94,60	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-368</b>	93,81	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-89</b>	93,60	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-115</b>	91,38	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-6</b>	89,66	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-37</b>	88,94	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-109</b>	88,93	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 28. Identificación de la cepa S-EM-125 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-HO-125</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-G-6</b>	90,52	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-81</b>	90,46	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-290</b>	88,12	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-115</b>	87,88	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-5</b>	87,36	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	87,15	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-113</b>	87,00	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-47</b>	86,74	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 29. Identificación de la cepa S-EM-107 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-LM-107</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-EM-CV-254</b>	90,85	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-259</b>	83,93	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-342</b>	73,00	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-31</b>	71,08	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-322</b>	69,85	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-341</b>	69,00	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-311</b>	68,62	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-305</b>	68,54	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 30. Identificación de la cepa S-EM-240 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-CV-240</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>S-EM-CV-246</b>	93,36	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-304</b>	91,81	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-302</b>	89,75	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-289</b>	89,42	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-311</b>	87,17	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-316</b>	86,16	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-313</b>	86,07	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-258</b>	85,95	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 31. Identificación de la cepa S-EM-261 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-LM-261</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>S-EM-PR-349</b>	83,73	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-258</b>	80,12	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-305</b>	78,36	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-251</b>	73,20	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-285</b>	73,01	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-106</b>	72,20	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-367</b>	71,98	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-322</b>	70,90	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 32. Identificación de la cepa S-EM-302 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-LS-302</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>S-EM-LS-304</b>	96,24	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-316</b>	94,63	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-341</b>	93,24	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-106</b>	90,79	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-289</b>	89,94	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-311</b>	89,90	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-82</b>	89,29	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-314</b>	86,82	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 33. Identificación de la cepa S-EM-181 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-MA-181</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-G-45</b>	78,96	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-314</b>	77,21	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-305</b>	73,41	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-106</b>	73,37	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-258</b>	71,96	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-317</b>	71,90	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-261</b>	71,80	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-322</b>	70,73	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 34. Identificación de la cepa S-EM-341 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-PR-341</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-EM-LS-304</b>	88,03	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-302</b>	86,01	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-342</b>	84,53	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-289</b>	81,08	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-258</b>	78,54	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-345</b>	77,70	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-313</b>	75,85	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-82</b>	75,79	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 35. Identificación de la cepa S-O-21 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-O-21</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-O-29</b>	98,26	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-94</b>	98,19	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-109</b>	97,45	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-93</b>	96,46	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-323</b>	95,02	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-112</b>	94,91	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	94,61	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-24</b>	93,77	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 36. Identificación de la cepa S-O-47 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-O-47</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>S-O-56</b>	92,52	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-290</b>	92,33	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-361</b>	91,73	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-14</b>	90,87	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-81</b>	90,48	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-326</b>	88,21	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-93</b>	87,73	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-112</b>	86,67	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 37. Identificación de la cepa S-O-64 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-O-64</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>S-O-26</b>	98,61	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-109</b>	95,15	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-112</b>	94,12	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-40</b>	93,41	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-290</b>	93,30	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-360</b>	91,80	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-47</b>	91,80	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-24</b>	91,40	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 38. Identificación de la cepa S-O-14 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-O-14</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>S-O-47</b>	97,57	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-290</b>	97,12	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-112</b>	94,02	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-360</b>	93,30	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-81</b>	93,12	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-93</b>	92,80	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-320</b>	92,70	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-115</b>	92,51	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 39. Identificación de la cepa S-O-302 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-O-302</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>S-EM-LM-112</b>	92,00	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-109</b>	91,62	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-40</b>	90,40	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-262</b>	89,65	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-26</b>	89,15	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-250</b>	87,65	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-368</b>	87,34	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	87,14	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 40. Identificación de la cepa S-O-323 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-O-323</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>S-O-290</b>	97,91	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-275</b>	97,19	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-109</b>	95,22	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-326</b>	95,17	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	95,13	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-29</b>	93,46	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-112</b>	92,71	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-40</b>	92,45	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 41. Identificación de la cepa S-O-275 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-O-275</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>S-O-290</b>	98,63	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-323</b>	98,34	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-326</b>	95,98	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-109</b>	95,22	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-40</b>	95,15	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	93,91	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-56</b>	93,47	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-81</b>	93,25	<i>S. cerevisiae</i>	



Tabla 42. Identificación de la cepa S-O-285 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-O-285</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-EM-PR-349</b>	91,22	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-261</b>	88,86	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-251</b>	88,16	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-258</b>	82,35	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-367</b>	80,75	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-289</b>	77,88	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-31</b>	77,03	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-30</b>	76,55	<i>S. cerevisiae</i>	

Cabe resaltar que en el grupo de cepas de *S. cerevisiae* analizadas aparecen cuatro cepas que difieren del resto, concretamente la S-EM-113, S-EM-352, S-EM-310 y S-EM-266, de las cuales se presenta su identificación y porcentajes de similitud a otras cepas de la librería en las tablas 43, 44, 45 y 46. En estas cuatro cepas los mayores porcentajes de similitud se corresponden con cepas de *Hanseniaspora*, concretamente la S-EM-113 y la S-EM-352 se asemejan más a *H. osmophila* mientras que S-EM-310 y S-EM-266 tienen una identidad mayor con *H. uvarum*. Los espectros de masas de las cuatro cepas mencionadas se presentan en las figuras 62, 63, 64 y 65. Estas cepas concretamente parecen presentar un perfil en su espectro de masas más parecido al perfil del espectro típico de cepas del género *Hanseniaspora* que al perfil del espectro de *S. cerevisiae*. Este hecho coincide con los resultados reflejados en las tablas para las identificaciones de cepas de *S. cerevisiae*, en las cuales la primera identificación diferente a *S. cerevisiae* corresponde a cepas de especies del género *Hanseniaspora*, en porcentajes de similitud que oscilar entre el 40-20%.

Tabla 43. Identificación de la cepa S-EM-113 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-LM-113</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar
<b>S-EM-PR-352</b>	83,57	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar
<b>NS-G-51</b>	79,34	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-49</b>	71,60	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-40</b>	71,25	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-47</b>	69,44	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-43</b>	69,36	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-33</b>	66,10	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-53</b>	64,57	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	

Tabla 44. Identificación de la cepa S-EM-352 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-PR-352</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar
<b>S-EM-LM-113</b>	93,38	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar
<b>NS-G-51</b>	81,98	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-47</b>	77,01	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-43</b>	75,39	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-49</b>	74,81	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-40</b>	66,38	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-53</b>	65,59	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<b>NS-G-39</b>	59,91	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	

Tabla 45. Identificación de la cepa S-EM-310 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-LS-310</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar
<b>S-EM-LM-266</b>	81,13	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar
<b>NS-EM-VR-101</b>	78,06	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-EM-VR-125</b>	77,10	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-EM-CV-1</b>	76,47	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-O-23</b>	75,23	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-O-57</b>	74,62	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-O-157</b>	69,99	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-EM-CV-25</b>	68,74	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	

Tabla 46. Identificación de la cepa S-EM-266 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>S-EM-LM-266</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar
<b>NS-O-57</b>	96,13	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-EM-VR-125</b>	95,52	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-EM-VR-101</b>	94,14	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-EM-CV-1</b>	93,57	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-O-23</b>	93,29	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-O-157</b>	87,34	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-EM-CV-25</b>	85,58	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-PDC-105</b>	85,19	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	

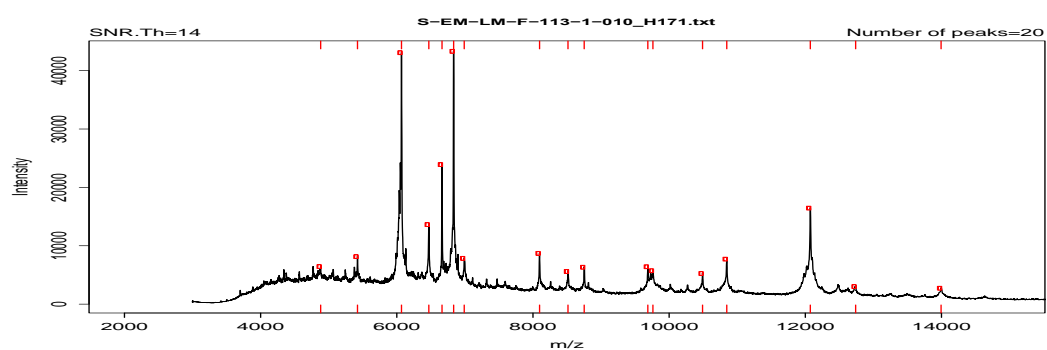


Figura 62. Espectro de masas de la cepa S-EM-113

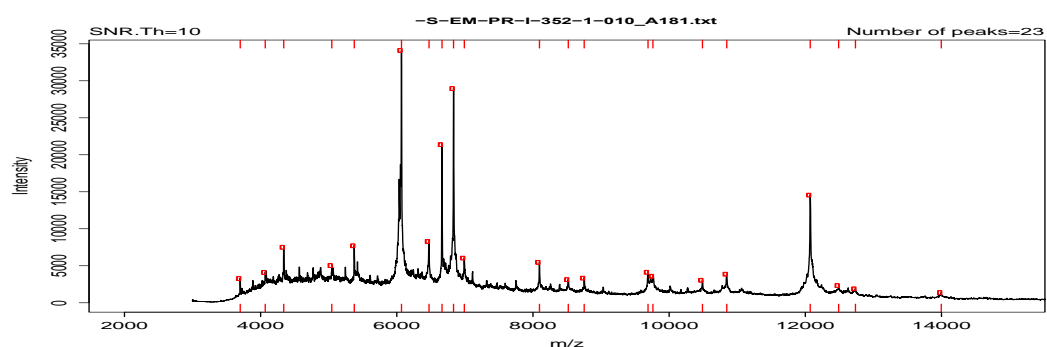


Figura 63. Espectro de masas de la cepa S-EM-352

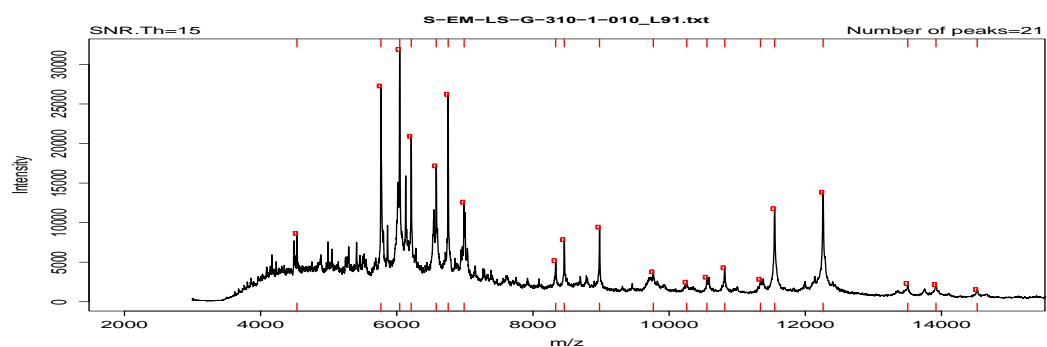


Figura 64. Espectro de masas de la cepa S-EM-310

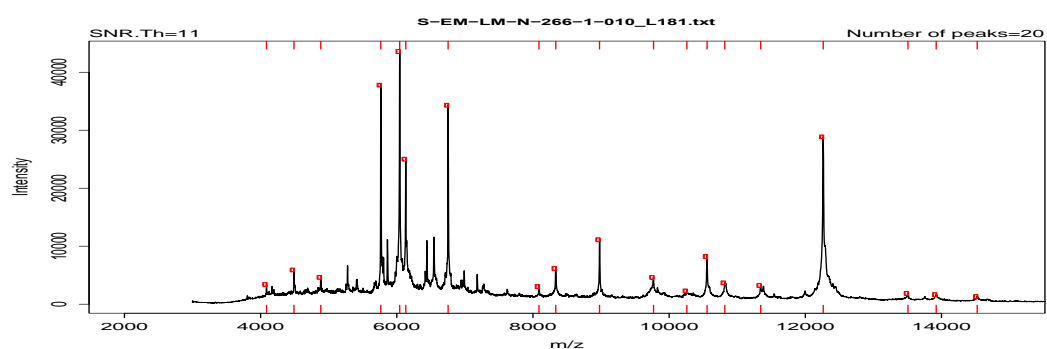


Figura 65. Espectro de masas de la cepa S-EM-266

La técnica de MALDI-TOF MS desarrollada en esta tesis no permite una diferenciación clara a nivel de cepa, sin embargo en un futuro se pretende agrupar las cepas por

porcentajes de similitud. Cabe destacar, que en el análisis de los espectros de masas al realizar la identificación utilizando la librería se ha observado una mayor similitud entre cepas del género *Saccharomyces*, las cuales crecieron en medio lisina, respecto a las cepas aisladas inicialmente como *S. cerevisiae*.

En estudios realizados por Agustini et. al., 2014 se comprueba que aproximadamente el 50% de las cepas que analizan mediante MALDI-TOF MS de *S. cerevisiae* presentan valores de puntuación de registro en Biotyper entre 2 y 0, que permiten confirmar solamente el género de las especies. Las posibles explicaciones para las puntuaciones más bajas obtenidas incluyen una ineficiente extracción de proteínas o una gran variabilidad en la expresión de la proteína dentro de esta especie. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis es posible confirmar en la mayor parte de los análisis realizados de cepas *S. cerevisiae* la identificación a nivel de género y especie, y en algunos casos incluso de cepa.

#### **4.2.2.2. Análisis de cepas de géneros no-*Saccharomyces*. Diferenciación a nivel de especie y cepa.**

Se ha partido de 118 cepas de no-*Saccharomyces* procedentes de las 4 bodegas especificadas en la parte experimental (apartado 3.2.1.2.), previamente identificadas por métodos moleculares y se han analizado mediante MALDI-TOF MS aplicando el procedimiento especificado en el apartado 3.4.2 de la Parte experimental, entre los puntos 3.4.2.1 y 3.4.2.8, para su diferenciación principalmente a nivel de especie. Los espectros de masas de cada de las cepas no-*Saccharomyces* analizadas figuran en el Anexo II. De forma genérica se pueden diferenciar un total de 16 especies:

1. *Aureobasidium pullulans*
2. *Cryptococcus amyloletus*
3. *Hanseniaspora opuntiae*
4. *Hanseniaspora osmophila*
5. *Hanseniaspora uvarum*
6. *Kluyveromyces marxianus*

7. *Lachancea thermotolerans*
8. *Metschnikowia fructicola*
9. *Metschnikowia pulcherrima*
10. *Metschnikowia viticola*
11. *Meyerozyma guilliermondii*
12. *Rhodosporidium toruloides*
13. *Saccharomyces cerevisiae*
14. *Torulaspora delbrueckii*
15. *Wickerhamomyces anomalus*
16. *Zygosaccharomyces bailii*

Como se ha indicado en el apartado 3.2.1. (Aislamiento y selección), dentro de este grupo no-*Saccharomyces* están incluidas, erróneamente, cepas del género *Saccharomyces*, que fueron aisladas en el medio lisina, específico para no-*Saccharomyces*. El medio de lisina permite seleccionar con cierto grado de certeza las especies de géneros no-*Saccharomyces*, pero su selectividad no es absoluta, y algunas cepas de *S. cerevisiae* son capaces de desarrollarse, aunque lentamente, en ese medio. Estas cepas fueron identificadas mediante técnicas moleculares como *S. cerevisiae*. Cabe resaltar, que la técnica MALDI-TOF MS, ha permitido detectar y confirmar esta hipótesis, ya que los espectros de masas de las cepas de *S. cerevisiae* incluidas en el grupo no-*Saccharomyces* coinciden con los espectros de masas de *S. cerevisiae*. Además, al comparar los espectros de masas de estas cepas de *S. cerevisiae* con los espectros de masas del resto de cepas incluidas en la librería, los mayores porcentajes de similitud correspondieron a cepas identificadas como *S. cerevisiae*.

#### **4.2.2.2.1. Inclusión de espectros de masas sintéticos en librería**

Con ayuda del programa R se han incluido en la librería un total de 118 espectros sintéticos de cepas pertenecientes a géneros no-*Saccharomyces*, resultantes del promedio de las tres réplicas analizadas para cada cepa.

En el Anexo IV figuran espectros de masas sintéticos de cepas no-*Saccharomyces* analizadas, concretamente un espectro de masas representativo de cada especie. A modo de ejemplo en la figura 66 se muestra el espectro sintético de la cepa NS-EM-1 correspondiente a la especie *Hanseniaspora uvarum* que es la más abundante encontrada en este grupo.

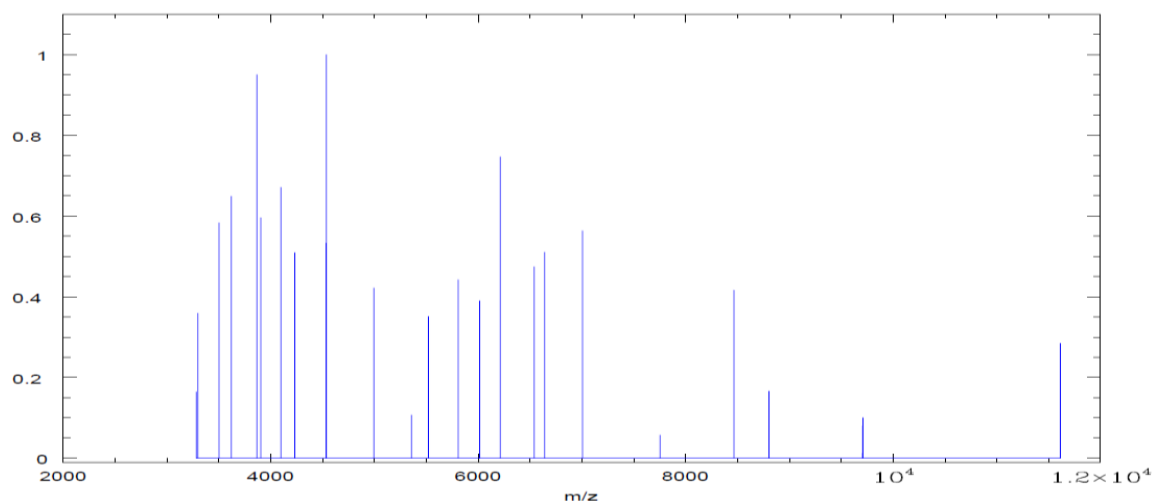


Figura 66. Espectro de masas “sintético” de líneas seleccionadas incluido en la librería de espectros para *Hanseniaspora uvarum* (cepa NS-EM-1)

En la bibliografía se dispone de diversos estudios de levaduras mediante MALDI-TOF MS; sin embargo, la mayoría de los trabajos identifican levaduras utilizando software comerciales y librerías en las cuales están disponibles los propios espectros de masas. Agustini et. al., 2014, analizaron mediante MALDI-TOF MS cepas de levadura aisladas de uvas en viñedos localizados en Brasil, utilizando el software Biotyper de la casa comercial Bruker para procesar los datos e identificar las levaduras. Parte de las levaduras aisladas por estos autores, tales como *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii*, *H. uvarum*, *P. galeiformis*, *C. sorbosa* y *C. krusei*, estaban presentes en la librería comercial; de acuerdo con los criterios de identificación aplicados, únicamente fueron identificadas dos especies de forma altamente probable, concretamente *P. guilliermondii* y *H. uvarum*; en el resto de levaduras la identificación fue únicamente de género, segura o probable, o bien sin identificación fiable.

Otras levaduras aisladas no estaban incluidas en la librería comercial, por lo que aportaron nuevos espectros de masas creando una librería suplementaria mediante el empleo del propio software comercial. Los espectros de masas añadidos correspondieron a especies de levadura de *H. puntiae*, *I. terrícola*, *P. sporocuriosa*, *C. diversa*, *C. zemplina*, *C. apícola*, *C. heveanensis*, *P* y *myanmarensis*.

En esta tesis se han aportado espectros de levaduras aisladas de la uva, algunas coincidentes con las mencionadas por estos autores y otras no; la principal diferencia de este trabajo respecto a las publicaciones bibliográficas, además de los tipos de especies aisladas, ha sido la elaboración de una librería de espectros propia e independiente del software Biotyper además del empleo de porcentajes de similitud entre la levadura ensayada con el resto de cepas de la librería.

#### **4.2.2.2.2. Estudio de los espectros de masas de cepas vínicas incluidos en la librería**

Se han estudiado las cepas incluidas en la librería agrupándolas por especie y verificando la existencia o no de concordancia entre ellas por comparación visual de los espectros de masas y mediante el empleo de la librería creada y el programa estadístico R.

Se presentan los resultados en forma de figuras en las que aparecen agrupados los espectros de masas de una misma especie y en tablas aparecen las identificaciones de especie resultantes y porcentajes de similitud entre las cepas de la librería, quedando limitado la tabla a los nueve candidatos con mayor porcentaje. En total se han estudiado 16 especies diferentes, teniendo en cuenta que una de ellas es *S. cerevisiae*.

##### **4.2.2.2.2.1. Cepas especie *Aureobasidium pullulans***

En este caso, ocho de las nueve cepas analizadas presentan visualmente el mismo perfil en su espectro de masas (ver figura 67). La cepa NS-PDC-134 muestra un espectro de masas claramente diferente al resto. Mediante empleo de la librería se han identificado, por un lado, dos de las cepas con espectro de masas similar (NS-O-70 y NS-PDC-129) y por otro la

cepa NS-PDC-134 que difiere del resto. Las tablas 47, 48 y 49 presentan la identificación de especie y los porcentajes de similitud. Para la cepa NS-O-70, el primer porcentaje de similitud en la tabla 47, corresponde al 100% consigo misma y las siguientes candidatas a cepas de su misma especie. La cepa NS-O-129, presenta el mismo comportamiento que la cepa NS-O-70. Para la cepa NS-PDC-134, el porcentaje de similitud es del 100% consigo misma, sin embargo, las candidatas siguientes en la tabla 49 no corresponden a cepas de la misma especie lo cual confirma las diferencias visuales comentadas. En principio, esta discordancia con el resto de cepas de *A. pullulans* podría atribuirse a un error experimental o bien cabe la posibilidad de que exista una diferencia real.

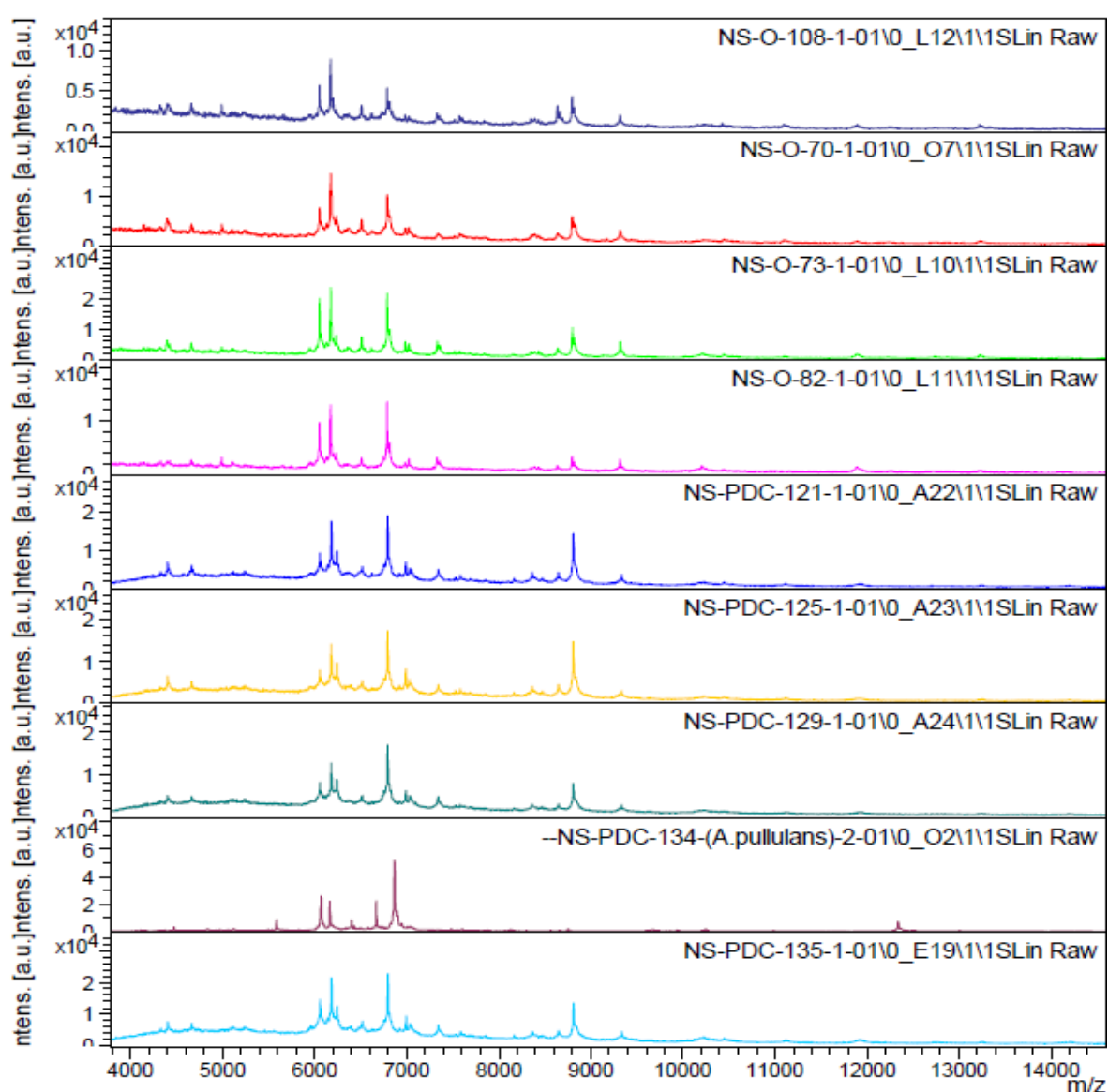


Figura 67. Espectros de masas de cepas de la especie *A. pullulans*



Tabla 47. Identificación de la cepa NS-O-70 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie identificada	Observaciones
NS-O-70	100,00	<i>Aureobasidium pullulans</i>	*correcto
NS-O-73	91,12	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-135	89,29	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-O-105	88,55	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-O-82	88,32	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-121	88,13	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-125	87,66	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-129	87,17	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-132	35,36	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	

Tabla 48. Identificación de la cepa NS-PDC-129 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-129	100,00	<i>Aureobasidium pullulans</i>	*correcto
NS-PDC-135	98,82	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-125	98,19	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-121	97,98	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-O-73	82,31	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-O-70	80,68	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-O-82	76,23	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-O-105	74,32	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-132	36,12	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	

Tabla 49. Identificación de la cepa NS-PDC-134 y porcentaje de similitud con cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-134	100,00	<i>Aureobasidium pullulans</i>	*correcto
NS-O-69	97,70	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-O-61	95,69	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-261	95,53	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	
NS-PDC-191	93,69	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-193	90,36	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
MP- Tipo- CECT11202	89,37	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> Tipo- CECT11202	
NS-PDC-195	82,12	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-14	80,24	<i>Metschnikowia fructicola</i>	

#### 4.2.2.2.2. Cepas especie *Cryptococcus amyloilentus*

Del total de cepas no-*Saccharomyces* nueve estaban identificadas por técnicas moleculares como *C. amyloilentus*. Las cepas de esta especie presentan mayor variedad de perfiles en sus espectros de masas (ver figura 68).

Debido a las diferencias visuales de los perfiles de algunos de los espectros de masas correspondientes a cepas de esta especie, se presentan las tablas de identificación de especie y porcentajes de similitud de las nueve cepas, ver tablas de 50 a 58.

Cabe resaltar el espectro de masas de la cepa NS-PDC-243 que tiene un perfil diferente al resto. En la tabla 52, se puede observar que esta cepa se parece, como es lógico, a ella misma un 100% y como segunda candidata aparece una cepa de *S. cerevisiae*, S-EM-PR-352. Se ha identificado la cepa S-EM-PR-352 (ver tabla 59) y se llega a la conclusión que esta cepa puede que esté mal identificada ya que los porcentajes más altos de similitud a excepción del primero (S-EM-PR-352) y segundo (S-EM-LM-113, ver tabla 60) corresponden a cepas de no-*Saccharomyces*, concretamente a *H. osmophila*. Igualmente, en la tabla 56, se muestra la identificación de la cepa NS-PDC-257, destacando la presencia de unos porcentajes de similitud muy altos con cepas del género *Metschnikowia*. La identificación de las cepas NS-PDC-261 y NS-PDC-262 se presenta en las tablas 57 y 58. Ambas especies muestran porcentajes de similitud muy altos con cepas de diferentes especies a *C. amyloilentus*. Las cinco cepas comentadas no presentan porcentajes de similitud altos con cepas de la especie *C. amyloilentus*, por lo que se puede considerar que o no corresponden a esta especie o son cepas con espectros de masas diferentes al resto.

Las cepas NS-PDC-132, NS-PDC-178, NS-PDC-248, NS-PDC-249 y NS-PDC-254 presentan un espectro de masas similar y las cepas más similares a ellas corresponden a cepas de la misma especie, *C. amyloilentus*.

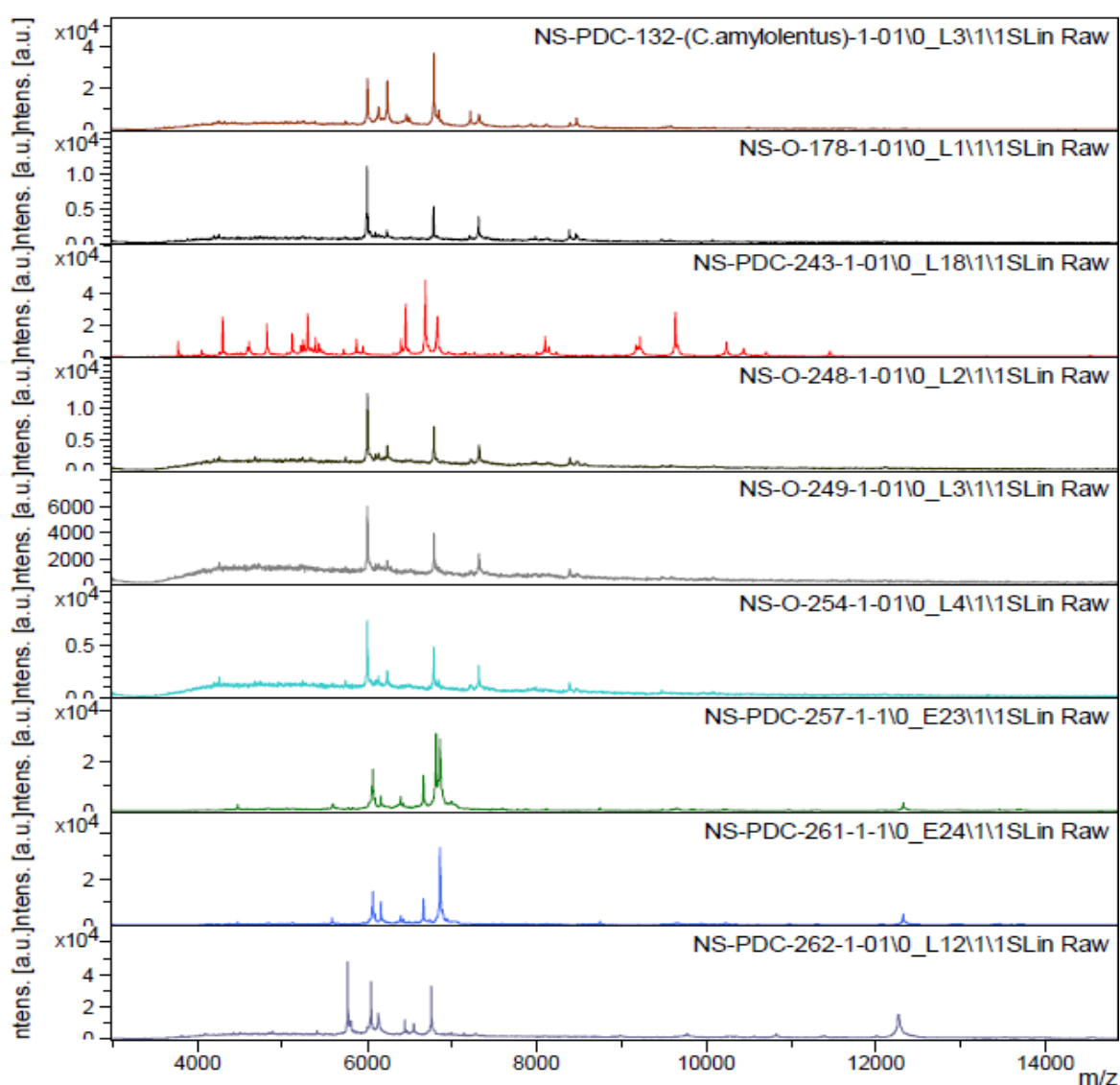
Figura 68. Espectros de masas de cepas de la especie *C. amyloletus*

Tabla 50. Identificación de la cepa NS-PDC-132 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-132	100,00	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	*espectro común
NS-PDC-178	84,59	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	*espectro común
NS-PDC-248	83,43	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	*espectro común
NS-PDC-254	67,34	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	*espectro común
NS-PDC-249	65,68	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	*espectro común
NS-EM-MA-67	27,80	<i>Lachancea thermotolerans</i>	
NS-PDC-41	27,63	<i>Lachancea thermotolerans</i>	
NS-O-46	26,65	<i>Lachancea thermotolerans</i>	
NS-PDC-121	26,10	<i>Aureobasidium pullulans</i>	

Tabla 51. Identificación de la cepa NS-PDC-178 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-178	100,00	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-248	89,06	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-132	71,95	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-249	70,57	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-254	66,88	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-G-58	24,24	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	
NS-G-66	23,51	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
NS-G-63	22,22	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	
NS-O-11	20,58	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	

Tabla 52. Identificación de la cepa NS-PDC-243 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-243	100,00	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*descartar
S-EM-PR-352	25,54	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-56	20,92	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-43	20,35	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-51	19,78	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-39	17,85	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-33	17,65	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-53	17,18	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-47	17,09	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	

Tabla 53. Identificación de la cepa NS-PDC-248 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-248	100,00	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-178	98,43	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-132	78,38	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-249	70,88	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-254	70,28	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-G-58	24,24	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	
NS-G-66	23,51	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
NS-G-63	22,22	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	
NS-O-11	20,58	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	

Tabla 54. Identificación de la cepa NS-PDC-249 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-249	100,00	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-254	92,57	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-178	86,37	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-248	86,19	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-132	74,80	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-O-82	26,14	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-121	26,10	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-125	26,10	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-PDC-135	26,02	<i>Aureobasidium pullulans</i>	

Tabla 55. Identificación de la cepa NS-PDC-254 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-254	100,00	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-249	98,40	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-248	89,57	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-178	85,46	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-PDC-132	80,34	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*espectro común
NS-EM-MA-67	27,80	<i>Lachancea thermotolerans</i>	
NS-PDC-41	27,63	<i>Lachancea thermotolerans</i>	
NS-O-46	26,65	<i>Lachancea thermotolerans</i>	
NS-O-82	26,14	<i>Aureobasidium pullulans</i>	

Tabla 56. Identificación de la cepa NS-PDC-257 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-257	100,00	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	*resultado no concluyente
NS-PDC-149	95,13	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-PDC-143	94,79	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-PDC-141	94,41	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-PDC-150	94,10	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-PDC-147	94,01	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-O-221	93,60	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-O-235	93,35	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-O-223	93,05	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-PDC-261	92,25	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	

Tabla 57. Identificación de la cepa NS-PDC-261 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-261	100,00	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	*resultado no concluyente
NS-PDC-134	96,44	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
NS-O-69	93,38	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-191	91,18	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-O-61	90,10	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
MP- Tipo- CECT11202	88,54	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> Tipo- CECT11202	
NS-PDC-193	86,86	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-14	79,29	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-195	79,00	<i>Metschnikowia fructicola</i>	

Tabla 58. Identificación de la cepa NS-PDC-262 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-262	100,00	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	*resultado no concluyente
NS-PDC-1	95,31	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-EM-CV-1	92,62	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-PDC-105	90,86	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-EM-CV-25	90,58	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-PDC-10	85,02	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-PDC-13	82,84	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
S-EM-LM-266	79,63	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-EM-VR-101	78,91	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	

Tabla 59. Identificación de la cepa S-EM-PR-352 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
S-EM-PR-352	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*descartada
S-EM-LM-113	93,38	<i>S. cerevisiae</i>	*descartada
NS-G-51	81,98	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-47	77,01	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-43	75,39	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-49	74,81	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-40	66,38	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-53	65,59	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-39	59,91	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	

Tabla 60. Identificación de la cepa S-EM-LM-113 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
S-EM-LM-113	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*descartada
S-EM-PR-352	83,57	<i>S. cerevisiae</i>	*descartada
NS-G-51	79,34	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-49	71,60	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-40	71,25	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-47	69,44	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-43	69,36	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-33	66,10	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-53	64,57	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	

#### 4.2.2.2.3. Cepas de géneros *Hanseniaspora*

Del género *Hanseniaspora* se han analizado cepas pertenecientes a tres especies, *H. opuntiae*, *H. osmophila* y *H. uvarum*; visualmente, el perfil de sus espectros de masas muestra claras diferencias, presentando sin embargo algunos iones en común. En la figura 69, a modo de ejemplo, se pueden observar los espectros de masas de tres cepas pertenecientes a las tres especies diferentes del género en estudio.

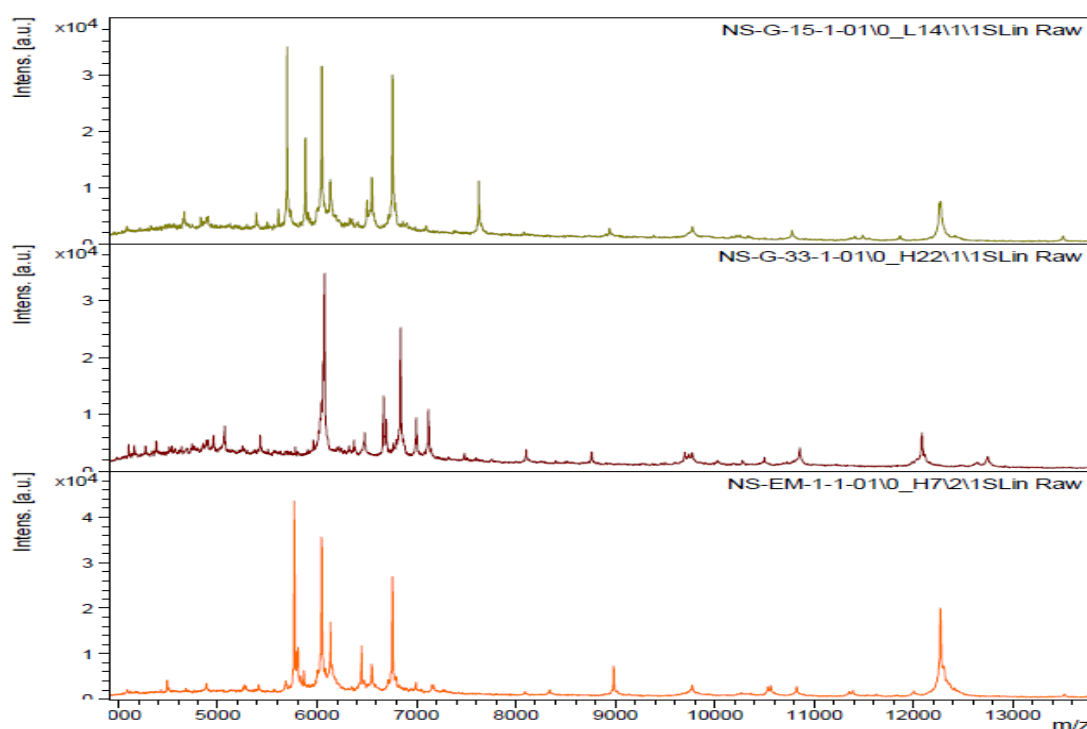


Figura 69. Espectros de masas de cepas de tres especies del género *Hanseniaspora*. a) *H. opuntiae* b) *H. osmophila* c) *H. uvarum*

A continuación se estudia cada una de las cepas de las tres especies comentadas.

#### 4.2.2.2.3.1. Cepas especie *Hanseniaspora opuntiae*

De esta especie se han analizado ocho cepas, las cuales todas presentan un mismo perfil en su espectro de masas. Se han elegido aleatoriamente, dos cepas de esta especie (NS-G-15 y NS-G-4) y se han identificado en librería (ver tabla 61 y 62, respectivamente). Ambas especies se identifican con ellas mismas al 100% y los porcentajes más altos de similitud se corresponden con cepas de la especie *H. opuntiae*, seguidos de cepas de la especie *H. uvarum*. Se puede afirmar que los espectros de masas de cepas de *H. opuntiae* y *H. uvarum* son muy similares según los resultados de la tabla 61 y 62.

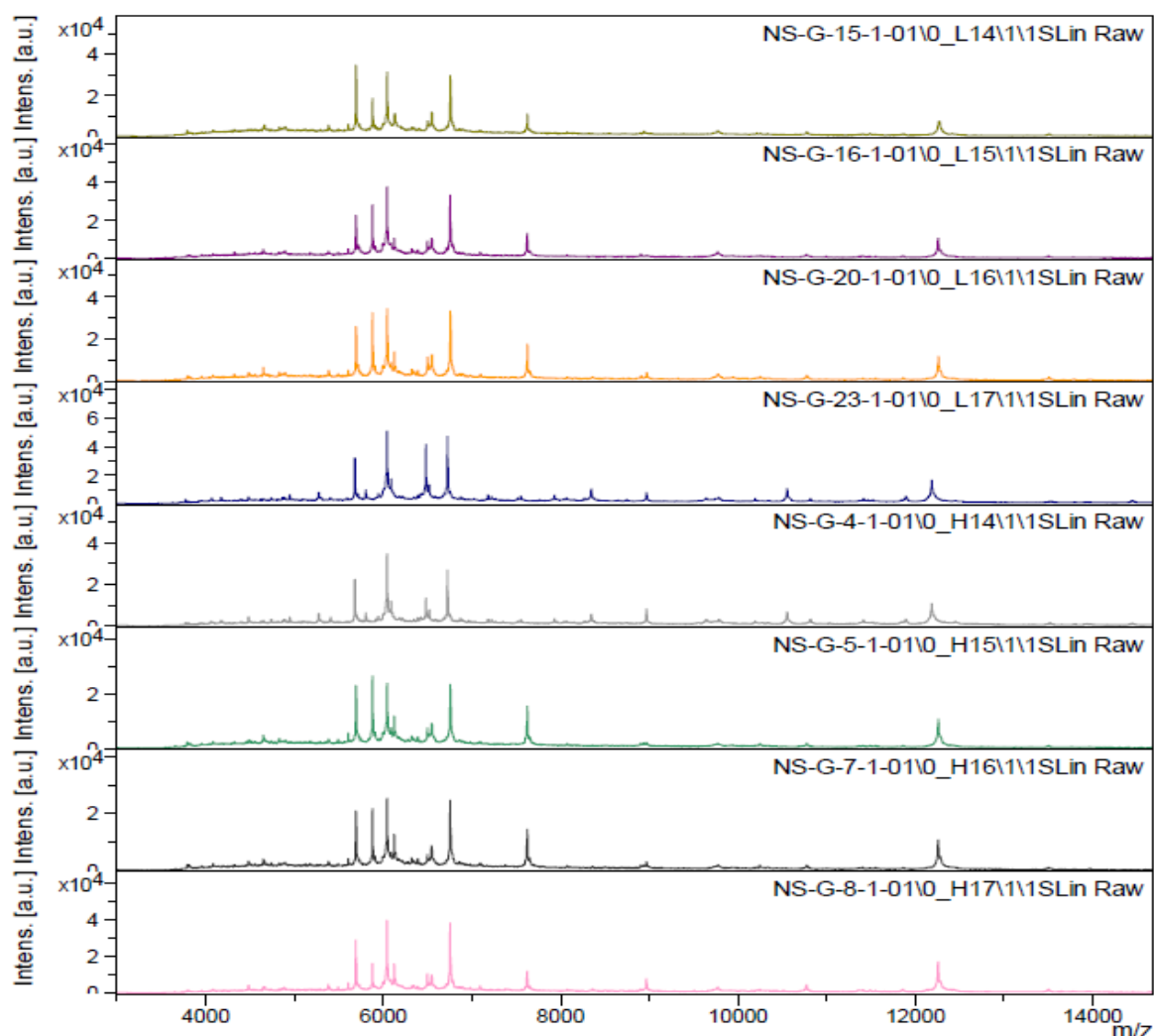


Figura 70. Espectros de masas de cepas de la especie *H. opuntiae*



Tabla 61. Identificación de la cepa NS-G-15 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-15	100,00	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-G-7	93,41	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-G-5	92,52	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-G-20	92,29	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-G-8	90,31	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-G-16	89,46	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-EM-CV-25	60,23	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*sp del mismo género
NS-PDC-262	58,69	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	*descartar
NS-O-57	49,64	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*sp del mismo género

Tabla 62. Identificación de la cepa NS-G-4 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-4	100,00	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-G-23	97,28	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-G-15	35,36	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-G-20	32,21	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-G-16	30,87	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-G-8	27,14	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*correcto
NS-O-57	25,08	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*sp del mismo género
NS-EM-CV-25	24,58	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*sp del mismo género
S-EM-LM-266	23,78	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar

#### 4.2.2.2.3.2. Cepas especie *Hanseniaspora osmophila*

Se han analizado diez cepas de la especie *H. osmophila*. Los espectros de masas se presentan en la figura 71. Nueve de las diez cepas analizadas presentan un espectro de masas similar. La cepa NS-G-35 visualmente presenta diferencias en los iones del espectro de masas respecto a las otras cepas de esta especie. Se han identificado tres cepas (NS-G-33, NS-G-35 y NS-G-49) de las nueve analizadas, empleando la librería. En las tablas 63, 64 y 65 se muestran los mayores porcentajes de similitud de ambas con el resto de cepas de la librería y su identificación con sí mismas como primera opción en un 100%. Las nueve cepas con perfil común en su espectro de masas aparecen en las tablas con porcentajes de similitud altos en comparación con ambas cepas.

Para la cepa NS-G-35, en la tabla 64 se muestran los resultados obtenidos tras su identificación mediante librería; concretamente se identifica con sí misma con un 100% de similitud y las siguientes candidatas más probables son tres cepas de la especie *Wickerhamomyces anomalus*, con porcentajes que oscilan entre el 87 y 81% de similitud.

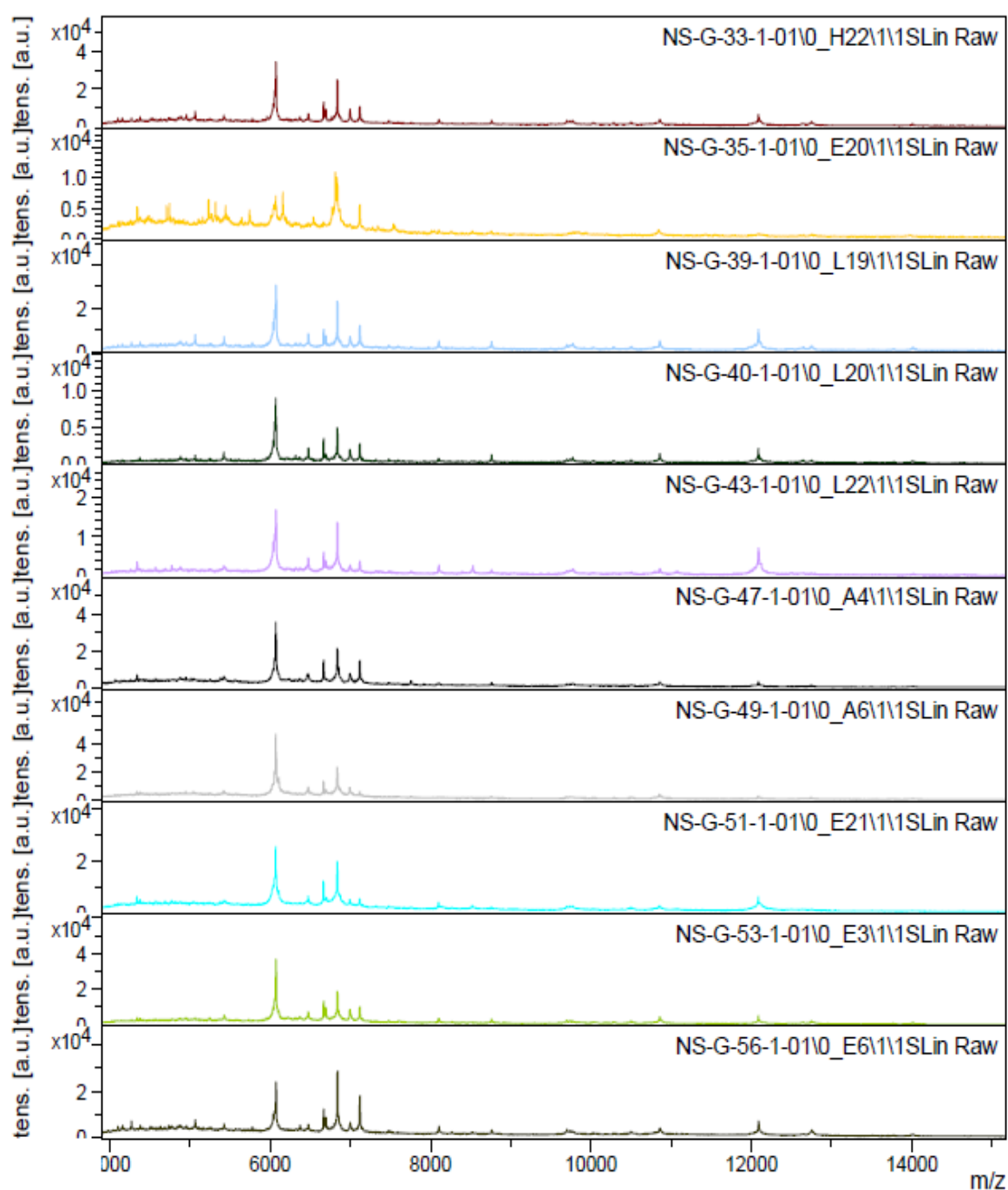


Figura 71. Espectros de masas de cepas de la especie *H. osmophila*

Tabla 63. Identificación de la cepa NS-G-33 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-33	100,00	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-56	97,97	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-40	94,51	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-39	94,50	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-53	86,57	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-43	77,94	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-51	76,42	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-47	75,86	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-49	74,47	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto

Tabla 64. Identificación de la cepa NS-G-35 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-35	100,00	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*descartar
NS-O-11	87,89	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	
NS-O-14	81,85	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	
NS-G-34	81,82	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	
NS-EM-VR-113	65,75	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-G-43	62,95	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-51	60,03	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-O-29	59,76	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-171	59,35	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	

Tabla 65. Identificación de la cepa NS-G-49 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-49	100,00	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-47	91,85	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-40	90,91	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-53	90,81	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-51	90,49	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
NS-G-43	89,06	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto
S-EM-LM-113	87,89	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar
S-EM-PR-352	86,91	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar
NS-G-56	85,81	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	*correcto

#### 4.2.2.2.3.3. Cepas especie *Hanseniaspora uvarum*

En la figura 72 y 73 se muestran los perfiles de los espectros de masas de las trece cepas analizadas de la especie *H. uvarum*. Todas tienen el mismo perfil excepto una, la cepa NS-O-120; en la tabla 66, se muestra la identificación de esta cepa, encontrando que los mayores porcentajes de similitud corresponden a cepas de la especie *M. viticola*, siendo la primera candidata esta misma cepa con un 100% de similitud. Sin embargo, al buscar la causa de esta discrepancia, se ha verificado mediante una revisión exhaustiva de la codificación de las cepas introducidas en la librería, que esta cepa es en realidad *M. viticola*, por lo que la identificación realizada con la librería es correcta como se puede ver en la tabla 66. Si bien se ha corregido este error en la librería, dado el avanzado estado de elaboración de este trabajo en el momento de la detección de este error, no se ha modificado el nombre de la especie en las tablas de resultados; no obstante este error se tendrá en cuenta en la publicación de los resultados.

En las tablas 67, 68 y 69, se muestran las identificaciones de tres de las trece cepas (NS-EM-CV-1, NS-O-1 y NS-PDC-1), observándose que todas tienen porcentajes de similitud altos con cepas de la especie *H. uvarum*. No se puede afirmar que cepas aisladas en la misma bodega o finca sean más similares entre ellas que cepas aisladas en bodegas o fincas diferentes, ya que los porcentajes de similitud varían sin seguir un patrón establecido.

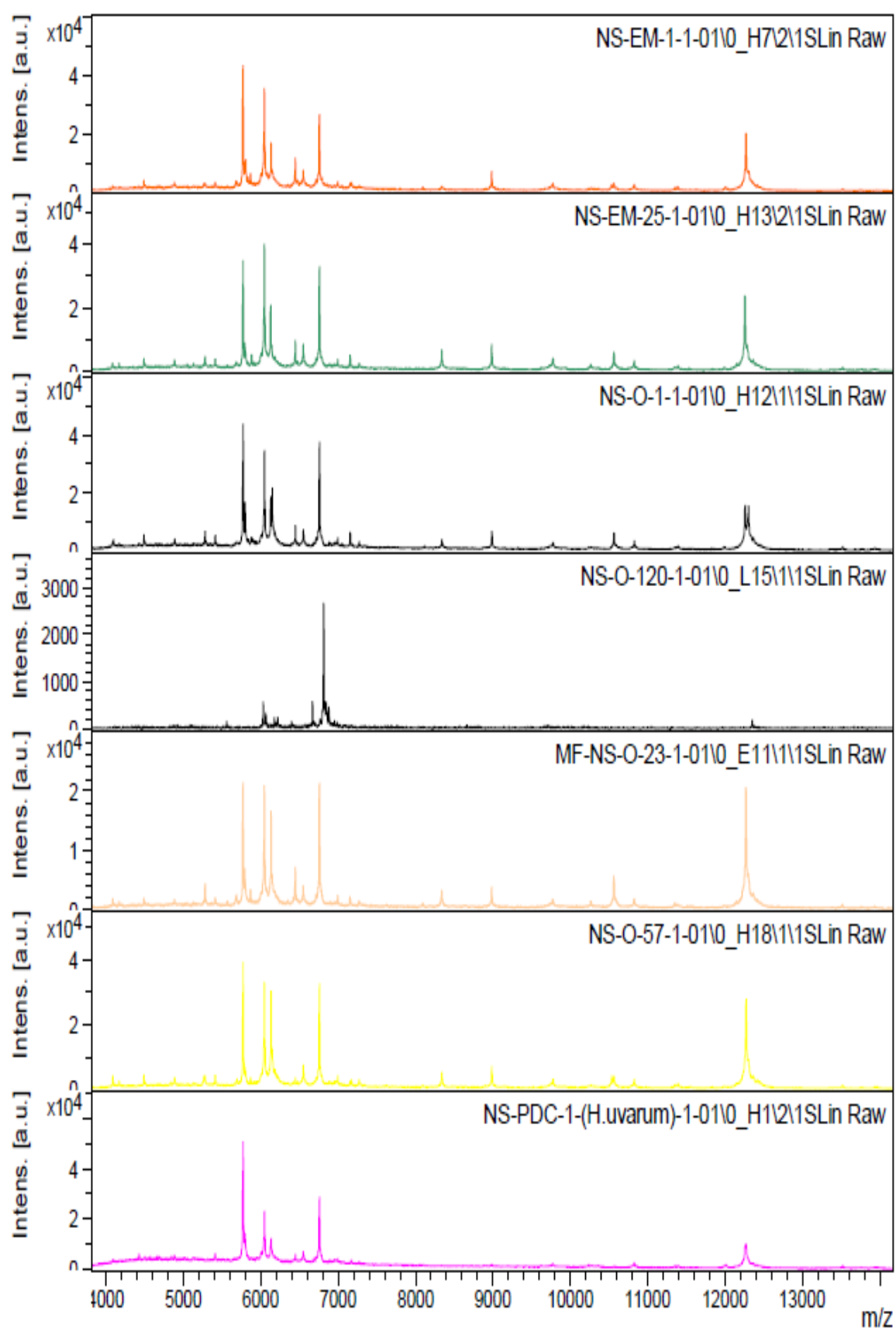


Figura 72. Espectros de masas de cepas de la especie *H. uvarum*

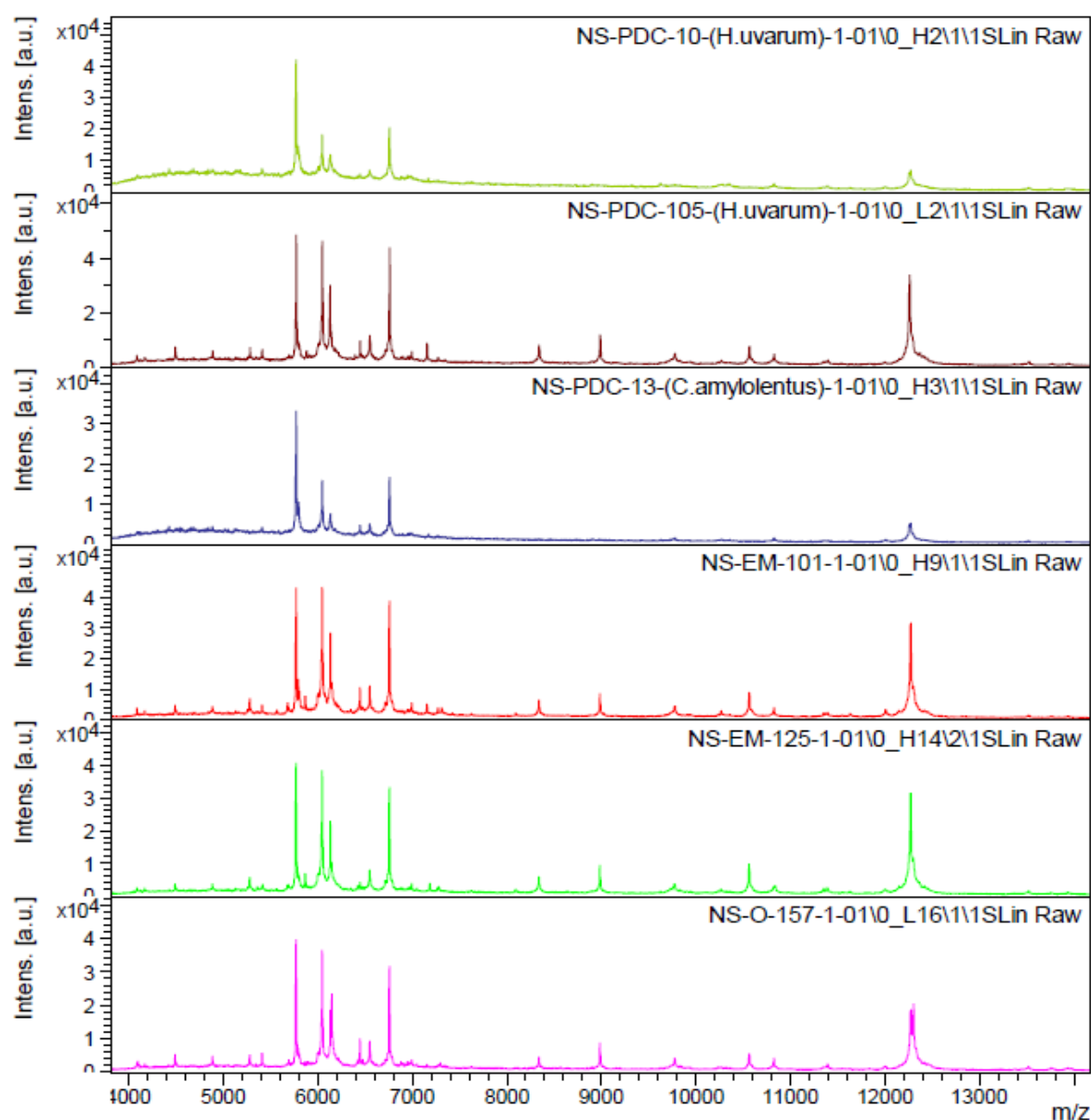


Figura 73. Espectros de masas de cepas de la especie *H. uvarum*

Tabla 66. Identificación de la cepa NS-O-120 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-O-120	100,00	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*Esta cepa realmente es <i>M. viticola</i> .
NS-O-97	96,68	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-100	96,26	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-35	93,38	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-32	92,37	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-45	87,16	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-111	73,64	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-110	73,30	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-118	70,53	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto

Tabla 67. Identificación de la cepa NS-EM-CV-1 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-EM-CV-1	100,00	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
S-EM-LM-266	97,60	<i>S. cerevisiae</i>	*descartar
NS-O-57	96,86	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-PDC-105	96,04	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-EM-VR-125	95,01	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-EM-VR-101	94,74	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-O-23	93,38	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-PDC-262	90,91	<i>Cryptococcus amylo lentus</i>	*descartar
NS-EM-CV-25	84,57	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto

Tabla 68. Identificación de la cepa NS-PDC-1 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-1	100,00	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-PDC-262	96,24	<i>Cryptococcus amylo lentus</i>	*descartar
NS-EM-CV-1	92,39	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-PDC-10	91,68	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-PDC-13	91,66	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-O-57	88,06	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-PDC-105	87,56	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-EM-VR-101	87,27	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-EM-VR-125	86,15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto

Tabla 69. Identificación de la cepa NS-O-1 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-O-1	100,00	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-O-157	92,77	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-PDC-105	87,77	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-EM-CV-25	87,35	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-EM-CV-1	81,86	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-PDC-262	76,41	<i>Cryptococcus amylo lentus</i>	descartar
S-EM-LM-266	74,32	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
NS-EM-VR-101	73,99	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
NS-PDC-1	72,87	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto

#### 4.2.2.2.4. Cepas especie *Kluyveromyces marxianus*

Las dos cepas analizadas de la especie *K. marxianus* presentan un espectro de masas similar como se puede apreciar en la figura 74. En la tabla 70 y 71 se muestra la identificación de las cepas NS-PDC-100 y NS-PDC-99 mediante la librería creada, observándose porcentajes de similitud entre sí del 93 y 89%, respectivamente, y un 100% de similitud consigo mismas.

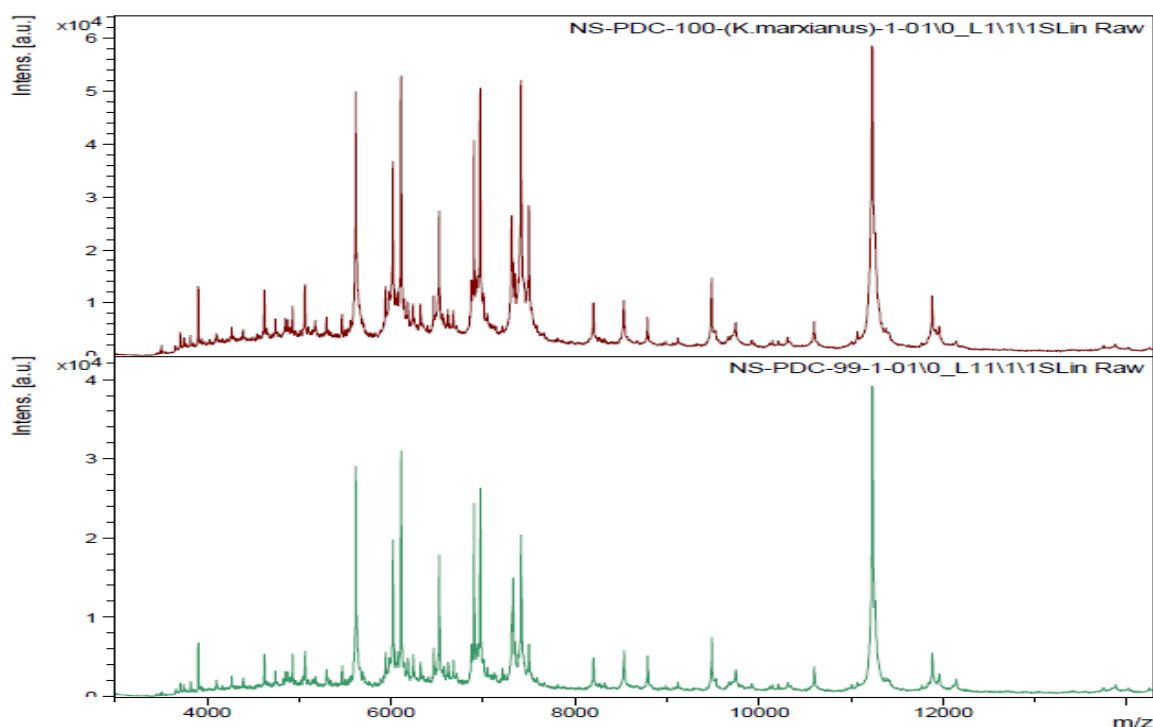


Figura 74. Espectros de masas de cepas de la especie *K. marxianus*

Tabla 70. Identificación de la cepa NS-PDC-100 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-100	100,00	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	*correcto
NS-PDC-99	93,64	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	*correcto
NS-G-58	25,74	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	
S-EM-CV-259	21,61	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-CV-254	20,38	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-PDC-178	17,34	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	
S-EM-LM-107	16,71	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-CV-258	15,85	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-PDC-44	15,82	<i>Lachancea thermotolerans</i>	



Tabla 71. Identificación de la cepa NS-PDC-99 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-99	100,00	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	*correcto
NS-PDC-100	89,40	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	*correcto
S-EM-CV-259	21,61	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-CV-254	20,38	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-PR-364	20,06	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-LM-107	16,71	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-CV-258	15,85	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-PDC-44	15,82	<i>Lachancea thermotolerans</i>	
NS-PDC-75	15,77	<i>Lachancea thermotolerans</i>	

#### 4.2.2.2.5. Cepas especie *Lachancea thermotolerans*

Las ocho cepas analizadas presentan un perfil similar en su espectro de masas (ver figura 75). Con los datos obtenidos en la identificación de dos de las ocho cepas analizadas (NS-G-13 y NS-PDC-75), se confirma que todas las cepas son similares entre sí, obteniéndose unos porcentajes altos de similitud consigo mismas e identificándose todas las cepas como una misma especie (ver tabla 72 y 73).

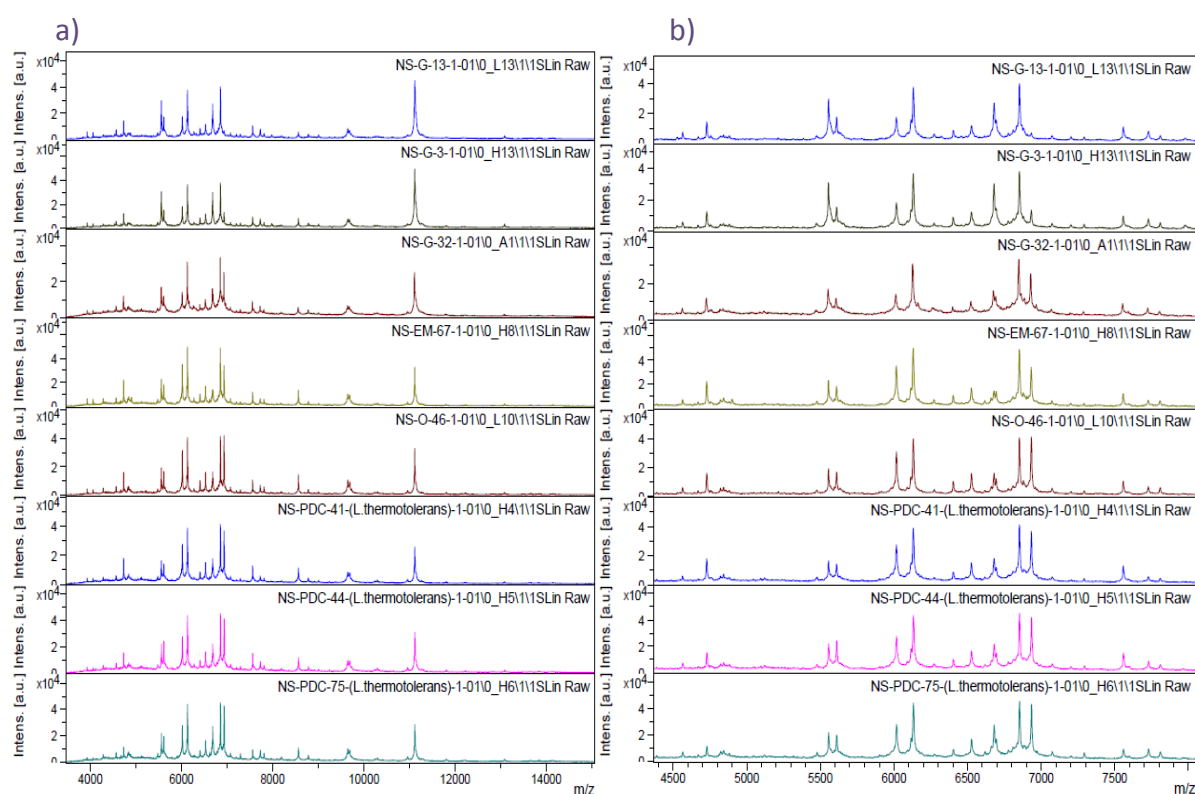


Figura 75. Espectros de masas de cepas de la especie *L. thermotolerans*. a) total b) ampliación

Tabla 72. Identificación de la cepa NS-G-13 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-13	100,00	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-G-3	98,12	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-G-32	85,67	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-EM-MA-67	65,66	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-EM-VR-119	58,72	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-O-46	56,66	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-EM-HO-136	46,40	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-PDC-248	31,55	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	
NS-PDC-178	31,50	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	

Tabla 73. Identificación de la cepa NS-PDC-75 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-75	100,00	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-O-46	95,14	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-PDC-44	94,56	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-PDC-41	93,99	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-EM-MA-67	92,48	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-EM-VR-119	92,47	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-EM-HO-136	90,66	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-G-3	61,53	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto
NS-G-32	59,60	<i>Lachancea thermotolerans</i>	*correcto

#### 4.2.2.2.6. Cepas del género *Metschnikowia*

Se han analizado distintas cepas de tres especies pertenecientes al género *Metschnikowia*, *M. viticola*, *M. fructicola* y *M. pulcherrima*. En la figura 76, se visualiza un ejemplo representativo del espectro de masas de una cepa de cada especie. Las tres especies tienen perfiles muy similares, existiendo pequeñas diferencias entre ellas que permiten distinguirlas mediante la librería creada. En el apartado 4.2.4., se estudia con más detalle la diferenciación de dos de estas especies, *M. fructicola* y *M. pulcherrima*, difícilmente diferenciables hasta el momento por métodos clásicos y moleculares.

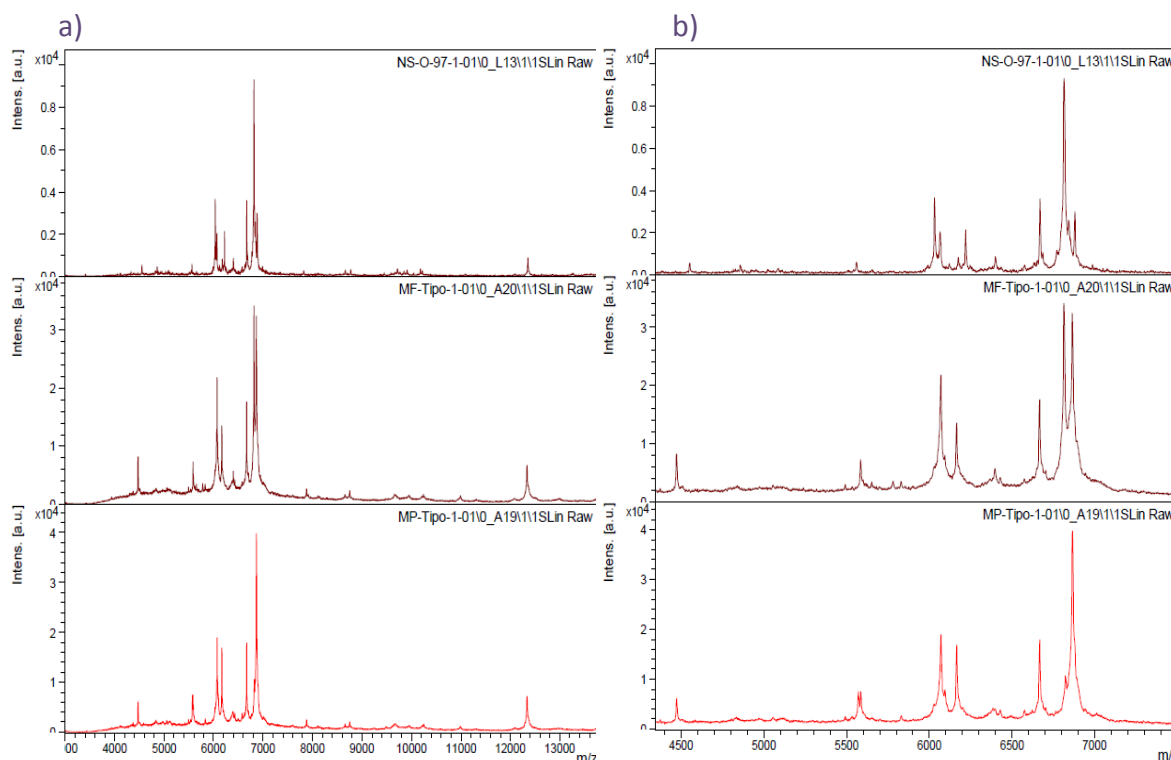


Figura 76. Espectros de masas de cepas de tres especies del género *Metschnikowia*. a) *M. viticola* b) *M. fructicola* c) *M. pulcherrima*. a) total b) ampliación

#### 4.2.2.2.6.1. Cepas especie *Metschnikowia fructicola*

Los resultados de estudios más detallados se han presentado en el apartado 4.2.4.2.1.

#### 4.2.2.2.6.2. Cepas especie *Metschnikowia pulcherrima*

Igualmente, estudios más detallados sobre esta especie se encuentran en el apartado 4.2.4.2.2.

#### 4.2.2.2.6.3. Cepas especie *Metschnikowia viticola*

En el caso de la especie *M. viticola*, las ocho cepas analizadas tienen espectros de masas muy similares. En la figura 77 se presentan sus espectros de masas y en las tablas 74, 75 y 76, la identificación de las cepas NS-O100 NS-O-32 y NS-O-97, en las que aparecen con mayores porcentajes de similitud las cepas analizadas e identificadas como *M. viticola*.

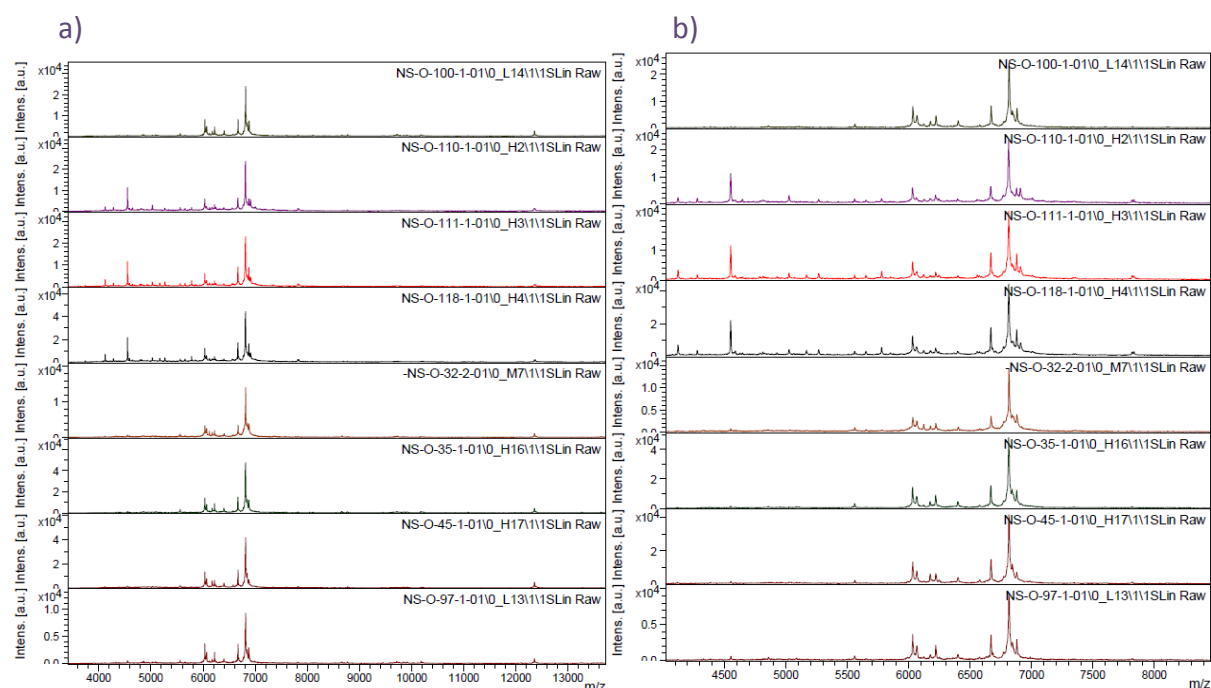


Figura 77. Espectros de masas de cepas de la especie *M. viticola*. a) total b) ampliación

Tabla 74. Identificación de la cepa NS-O-100 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-O-100	100,00	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-35	99,58	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-97	98,98	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-120	98,44	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*Esta sp es <i>M.viticola</i>
NS-O-32	92,03	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-45	91,65	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-111	76,19	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-110	74,96	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-PDC-207	73,95	<i>Metschnikowia fructicola</i>	*sp del mismo género

Tabla 75. Identificación de la cepa NS-O-32 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-O-32	100,00	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-120	99,21	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	* Esta sp es <i>M.viticola</i>
NS-O-97	96,95	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-100	95,97	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-35	93,69	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-45	92,92	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-111	78,12	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-110	75,99	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-118	75,32	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto

Tabla 76. Identificación de la cepa NS-O-97 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-O-97	100,00	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-120	98,10	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	* Esta sp es <i>M.viticola</i>
NS-O-100	97,20	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-35	95,18	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-32	91,29	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-45	89,08	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-111	75,28	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-110	74,42	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto
NS-O-118	71,50	<i>Metschnikowia viticola</i>	*correcto

#### 4.2.2.2.7. Cepas especie *Meyerozyma guilliermondii*

Se ha aislado (en la bodega Gordonzello, durante la vendimia de 2012) y analizado una única cepa de la especie *M. guilliermondii*, representando su espectro de masas en la figura 78. En la tabla 77, se muestra la identificación de esta cepa mediante la librería, obteniéndose un 100% de similitud consigo misma siendo el siguiente porcentaje de similitud del 17,94% con una cepa de la especie *C. amyloletus*, concretamente con la cepa NS-PDC-243, lo que indica que es una cepa muy diferente al resto de la librería por su baja similitud con las demás cepas.

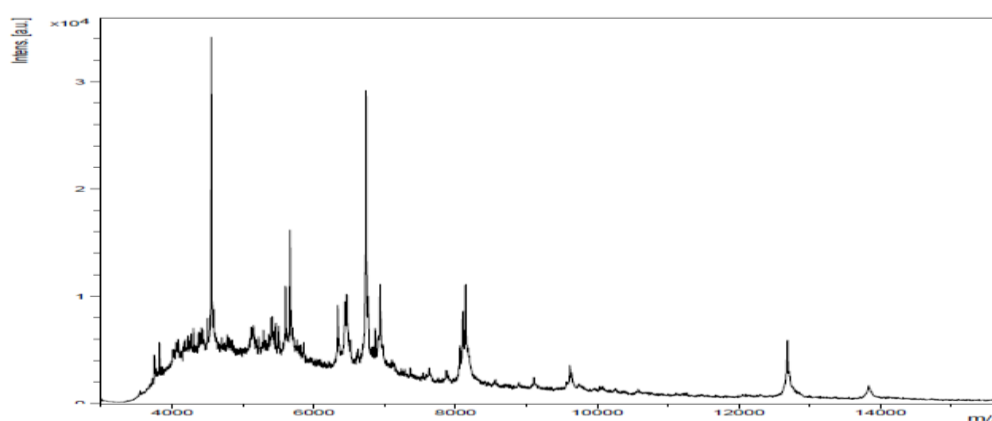


Figura 78. Espectro de masas de cepas NS-G-57 de la especie *M. guilliermondii*

Tabla 77. Identificación de la cepa NS-G-57 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-57	100,00	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	*correcto
NS-PDC-243	17,94	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	
NS-G-23	16,75	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	
NS-G-4	16,39	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	
NS-G-27	15,40	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
NS-O-111	15,27	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-O-110	14,98	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-O-118	14,97	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-G-72	14,34	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	

#### 4.2.2.2.8. Cepas especie *Rhodospordium toruloides*

En la bodega Gordonzello, durante la vendimia de 2012, se aislaron dos cepas de esta especie que han sido analizadas por MALDI-TOF MS y se muestran sus espectros en la figura 79, observándose un perfil similar, con pequeñas diferencias de iones.

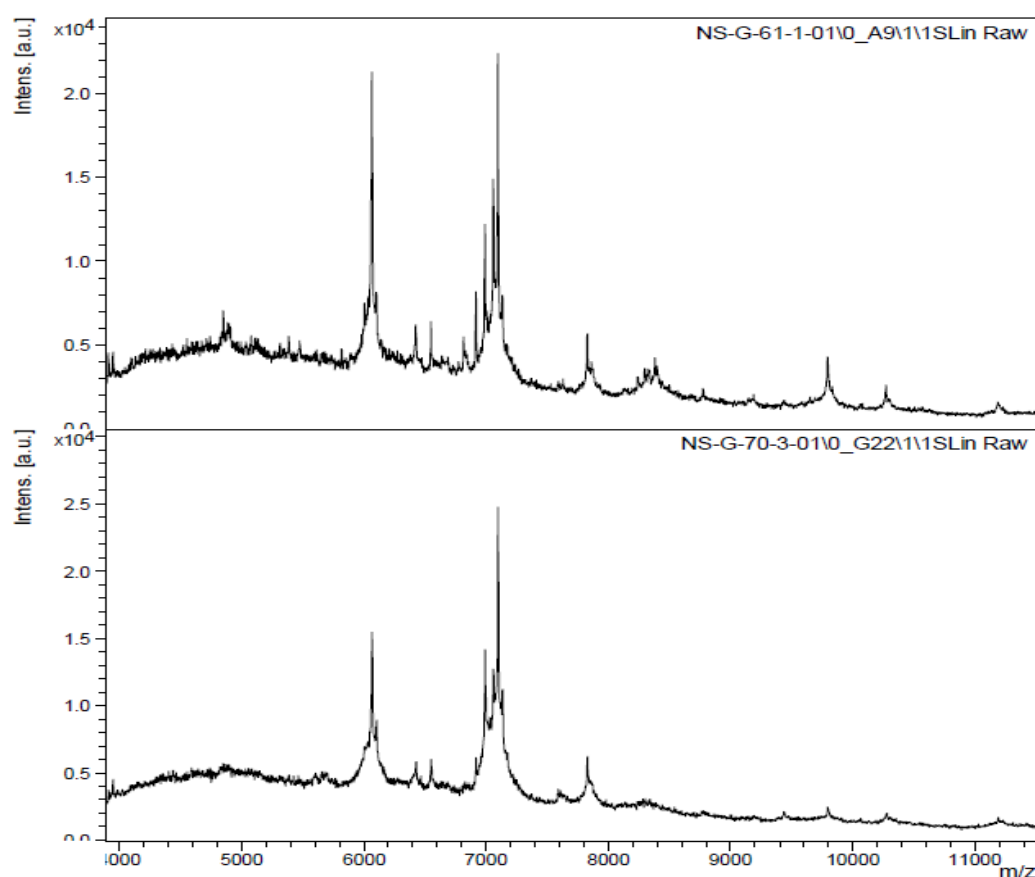


Figura 79. Espectros de masas de cepas de la especie *R. toruloides*

En las tablas 78 y 79 se presentan los resultados de comparación con el resto de cepas de la librería de las dos cepas NS-G-61 y NS-G-70. Ambas cepas presentan unos porcentajes de similitud del 51% aproximadamente, que si bien no es muy alto, pero este caso concreto puede servir de dato complementario con fines de identificación.

Tabla 78. Identificación de la cepa NS-G-61 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-61	100,00	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	*correcto
NS-G-70	51,78	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	*correcto
NS-O-120	51,19	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-O-100	45,85	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-O-35	45,10	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-O-45	44,26	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-O-97	43,93	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-PDC-178	39,29	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	
NS-O-110	33,49	<i>Metschnikowia viticola</i>	

Tabla 79. Identificación de la cepa NS-G-70 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-70	100,00	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	*correcto
NS-G-61	51,66	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	*correcto
NS-G-49	40,39	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-PDC-178	36,13	<i>Cryptococcus amyloilentus</i>	
NS-G-40	34,10	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-53	33,66	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-62	30,63	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
NS-G-47	30,55	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-33	30,11	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	

#### 4.2.2.2.9. Cepas especie *Saccharomyces cerevisiae*

Como ya se indicó en el apartado 3.2.1.2. en el grupo de no-*Saccharomyces* se aislaron, en la bodega Gordonzello durante la vendimia del año 2012, once cepas identificadas como *S. cerevisiae* por métodos moleculares que crecieron en medio de lisina. Al analizarlas por MALDI-TOF MS (ver figura 80 y 81) y posteriormente identificarlas utilizando la librería creada se confirma que en todos los casos se trata de cepas *S. cerevisiae* (NS-G-24, NS-G-30, NS-G-31, NS-G-37, NS-G-42, NS-G-44, NS-G-48, NS-G-50, NS-G-52, NS-G-

54, NS-G-55, ver tablas 80 a 90, respectivamente), destacándose que en muchas de estas cepas se cumple que los mayores porcentajes de similitud son entre cepas que se aislaron en el medio diferencial de lisina, específico para no-*Saccharomyces*, lo que hace pensar que estas cepas tienen iones en común que las diferencia de las cepas aisladas inicialmente como *S. cerevisiae*.

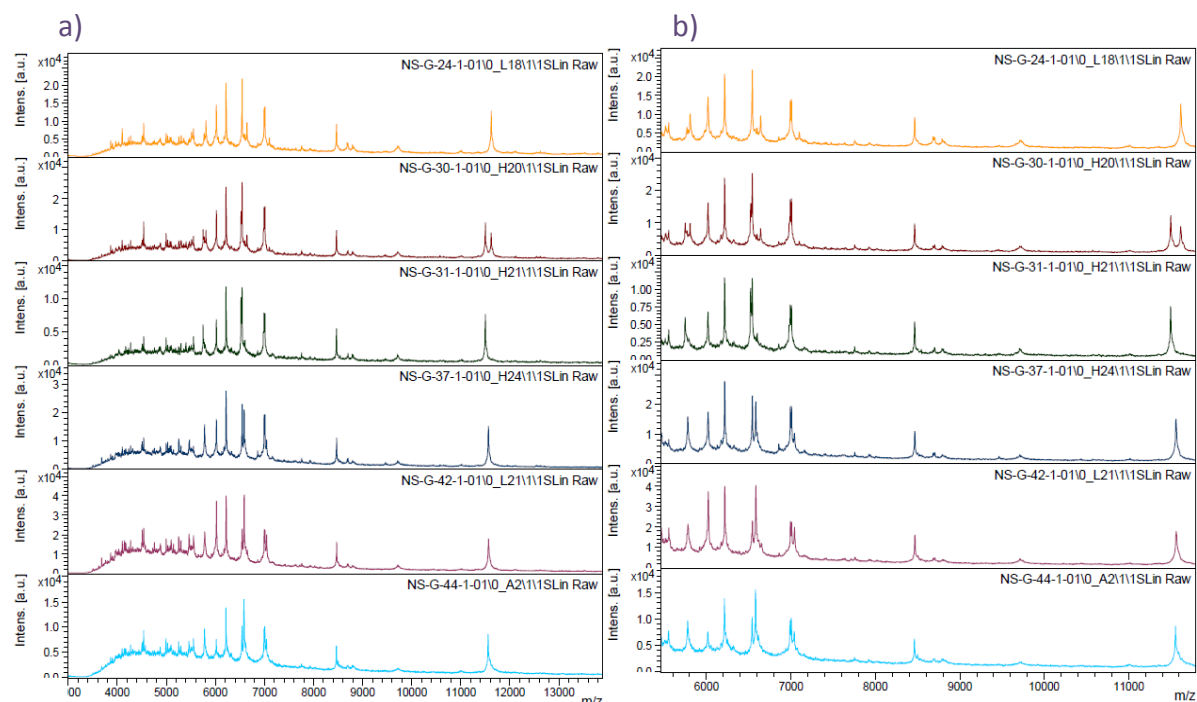


Figura 80. Espectros de masas de cepas de la especie *S. cerevisiae*. a) total b) ampliación

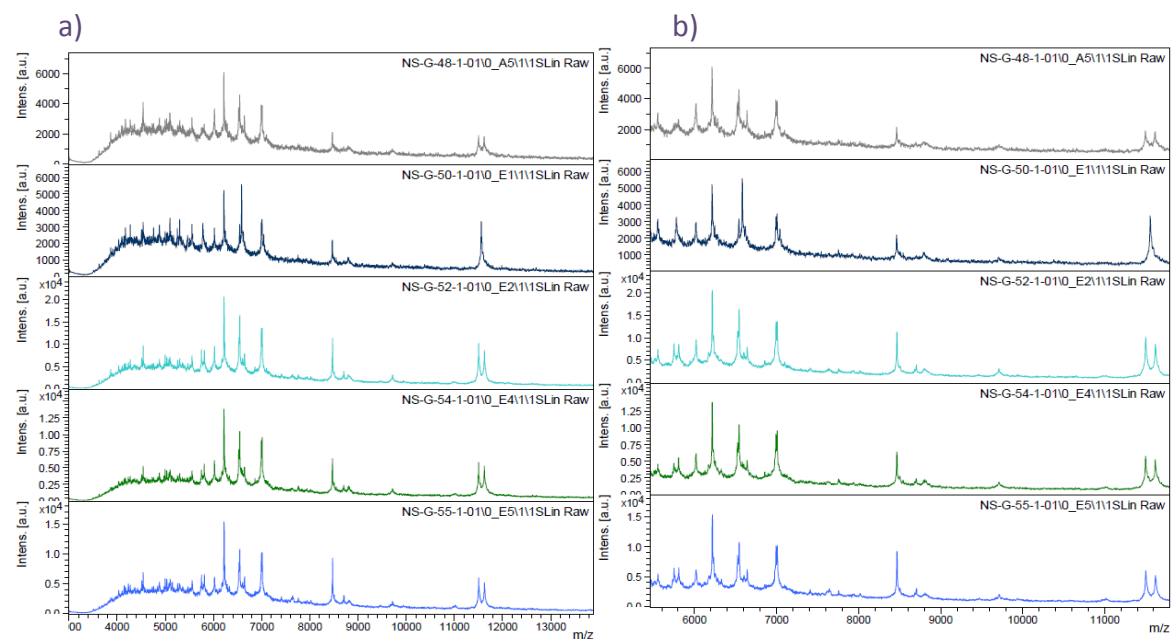


Figura 81. Espectros de masas de cepas de la especie *S. cerevisiae*. a) total b) ampliación



Tabla 80. Identificación de la cepa NS-G-24 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>NS-G-24</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>NS-G-30</b>	79,63	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-48</b>	79,22	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-52</b>	79,08	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-55</b>	78,28	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-54</b>	77,63	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-31</b>	74,11	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-240</b>	68,75	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-5</b>	66,15	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 81. Identificación de la cepa NS-G-30 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>NS-G-30</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-G-15</b>	94,05	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-31</b>	85,65	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-52</b>	85,27	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-258</b>	79,81	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LM-106</b>	79,79	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-55</b>	79,74	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-335</b>	79,53	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-48</b>	79,04	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 82. Identificación de la cepa NS-G-31 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>NS-G-31</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-G-15</b>	82,37	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-254</b>	79,48	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-30</b>	79,17	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-5</b>	78,84	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-PR-349</b>	77,06	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-258</b>	75,82	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-52</b>	74,75	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-55</b>	71,52	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 83. Identificación de la cepa NS-G-37 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>NS-G-37</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>S-EM-MA-91</b>	90,88	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-275</b>	88,20	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-250</b>	87,76	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-57</b>	87,29	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-81</b>	87,12	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-9</b>	86,79	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-16</b>	86,74	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-91</b>	84,20	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 84. Identificación de la cepa NS-G-42 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>NS-G-42</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>NS-G-37</b>	95,63	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	94,17	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-241</b>	94,06	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-16</b>	93,97	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-318</b>	93,71	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-44</b>	93,00	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-81</b>	92,87	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-CV-244</b>	92,68	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 85. Identificación de la cepa NS-G-44 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>NS-G-44</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
<b>NS-G-37</b>	95,51	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-12</b>	94,52	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-91</b>	93,94	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-MA-81</b>	93,84	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-16</b>	93,53	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-9</b>	91,53	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-42</b>	91,05	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-91</b>	90,22	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 86. Identificación de la cepa NS-G-48 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>NS-G-48</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>S-G-15</b>	91,53	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-30</b>	90,42	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-54</b>	88,98	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-24</b>	88,55	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-52</b>	85,96	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-EM-LS-304</b>	85,67	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-335</b>	84,88	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-55</b>	83,63	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 87. Identificación de la cepa NS-G-50 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>NS-G-50</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>NS-G-44</b>	92,61	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-37</b>	88,52	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-42</b>	87,39	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-6</b>	84,43	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-9</b>	83,26	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-89</b>	82,76	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-113</b>	82,65	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-12</b>	82,56	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 88. Identificación de la cepa NS-G-52 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>NS-G-52</b>	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>*correcto</i>
<b>NS-G-55</b>	97,80	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-31</b>	95,59	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-30</b>	94,41	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-54</b>	93,29	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-24</b>	89,92	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>NS-G-48</b>	84,61	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-5</b>	84,25	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-15</b>	82,68	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 89. Identificación de la cepa NS-G-54 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-54	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
NS-G-31	95,88	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-52	95,76	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-55	95,28	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-48	94,73	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-30	93,49	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-24	90,80	<i>S. cerevisiae</i>	
S-G-5	79,24	<i>S. cerevisiae</i>	
S-G-15	79,17	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 90. Identificación de la cepa NS-G-55 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-55	100,00	<i>S. cerevisiae</i>	*correcto
NS-G-52	96,89	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-31	92,17	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-30	92,09	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-54	91,41	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-24	88,10	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-PR-345	79,69	<i>S. cerevisiae</i>	
S-G-5	79,20	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-MA-99	77,07	<i>S. cerevisiae</i>	

#### 4.2.2.2.10. Cepas especie *Torulaspora delbrueckii*

Las siete cepas analizadas de esta especie tienen espectros de masas similares como se puede visualizar en la figura 82. Los porcentajes de similitud obtenidos para las cepas NS-G-27, NS-G-72 y NS-G-169 (Ver tablas 91, 92 y 93, respectivamente) usando el programa estadístico y la librería creada muestran que son muy similares entre sí. Cabe destacar que la cepa NS-G-9 es la cepa que tiene un porcentaje menor de similitud con el resto de cepas de la misma especie, entre el 37-47%; sin embargo, tiene un perfil similar al resto de cepas por lo que se identifica como la misma especie.

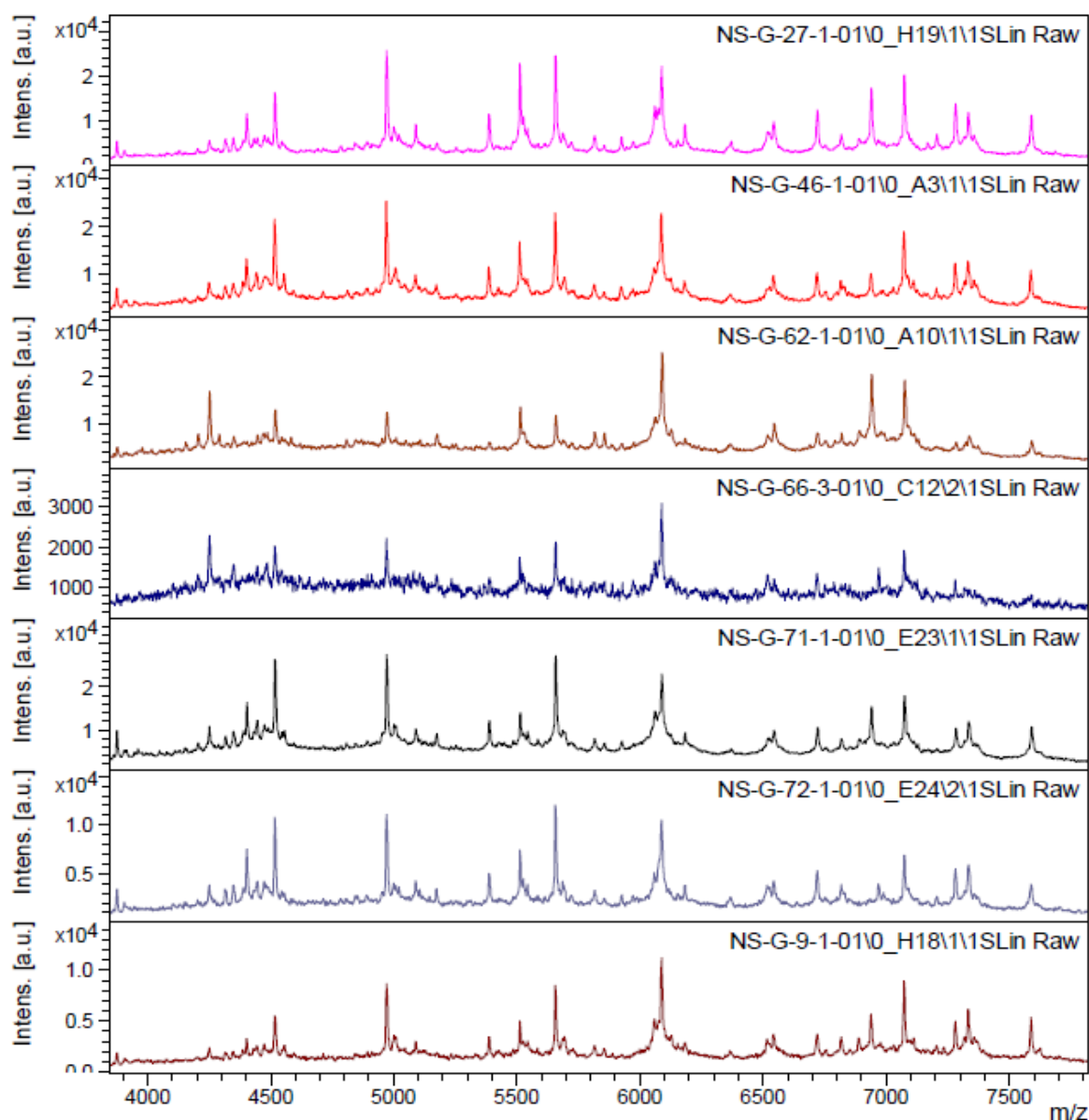

 Figura 82. Espectros de masas de cepas de la especie *T. delbrueckii*

Tabla 91. Identificación de la cepa NS-G-27 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-27	100,00	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-PDC-169	96,61	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-71	92,10	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-46	90,04	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-72	87,71	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-66	56,75	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-9	47,12	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
S-EM-PR-364	22,90	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-LM-114	20,49	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 92. Identificación de la cepa NS-G-72 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-72	100,00	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-46	98,48	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-71	92,22	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-PDC-169	88,55	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-27	87,30	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-66	63,92	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-9	43,39	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-57	22,96	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	
S-EM-PR-364	22,57	<i>S. cerevisiae</i>	

Tabla 93. Identificación de la cepa NS-PDC-169 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-169	100,00	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-27	98,23	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-71	92,63	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-72	90,88	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-46	80,28	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-66	55,91	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-9	37,51	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	*correcto
NS-G-61	20,26	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	
NS-G-58	18,04	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	

#### 4.2.2.2.11. Cepas especie *Wickerhamomyces anomalus*

En la figura 83 se presentan los espectros de masas de las cinco cepas identificadas por métodos moleculares como *W. anomalus* y posteriormente analizadas mediante MALDI-TOF MS. Cuatro de las cinco cepas (NS-O-11, NS-O-14, NS-PDC-167 y NS-PDC-171, ver tablas 94, 94, 95, 96 y 97, respectivamente) se identifican al 100% consigo mismas y presentan elevados porcentajes de similitud con el resto de cepas de la misma especie, apareciendo como primeras candidatas en la tabla las cepas de la misma especie. Se destaca, que las cepas NS-O-11 y NS-O14, ambas aisladas en la bodega Ossian, se parecen más entre sí, que a las otras dos cepas NS-PDC-167 y NS-PDC-171, aisladas en la bodega Pago de Carraovejas que a su vez también se parecen más entre sí. Esto indica que existe una diferenciación de especie a nivel de bodega.

Es importante resaltar, que en este grupo se ha detectado un error de muestreo, debido a que al identificar la cepa NS-O-34 en la librería (Ver tabla 98), no se identifica consigo misma sino que se identifica al 100%, con la cepa S-EM-LM-113. Por consiguiente, esta cepa queda descartada para todas las comparaciones realizadas ya que los datos no son concordantes.

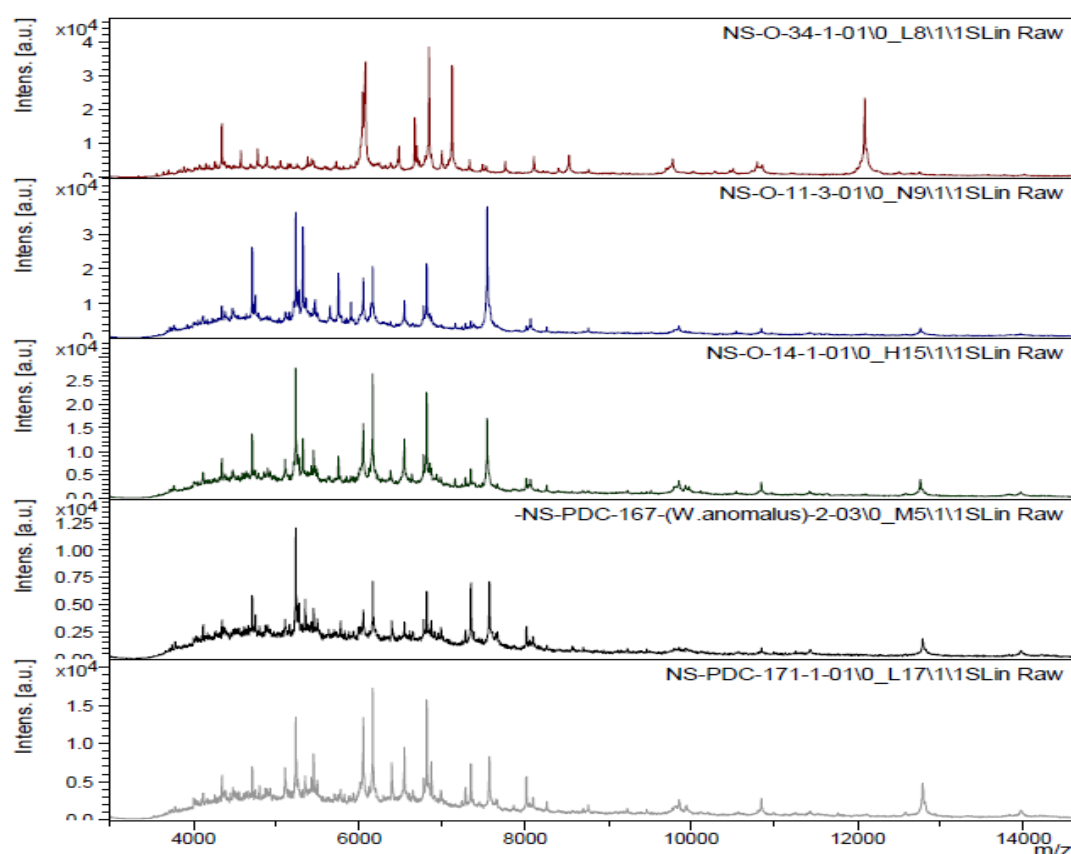


Figura 83. Espectros de masas de cepas de la especie *W. anomalus*

Tabla 94. Identificación de la cepa NS-O-11 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-O-11	100,00	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-O-14	92,17	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-G-34	80,72	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-G-35	62,46	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-PDC-171	62,27	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	
NS-PDC-167	56,33	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	
NS-EM-VR-113	52,14	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-O-29	48,44	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-O-88	47,71	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	

Tabla 95. Identificación de la cepa NS-O-14 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-O-14	100,00	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-O-11	94,83	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-G-34	91,22	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-PDC-171	77,83	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-PDC-167	67,57	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-G-35	66,66	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-EM-VR-113	51,28	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-O-29	47,50	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-O-88	46,98	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	

Tabla 96. Identificación de la cepa NS-PDC-171 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-171	100,00	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-PDC-167	88,27	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-O-14	75,36	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-G-34	72,67	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-PDC-193	66,29	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-194	59,38	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-195	58,83	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-191	58,68	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-O-221	56,08	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	

Tabla 97. Identificación de la cepa NS-PDC-167 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-PDC-167	100,00	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-PDC-171	97,29	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-O-14	74,44	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-G-34	67,92	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-O-11	55,07	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	*correcto
NS-EM-VR-113	50,64	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-G-35	49,73	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-O-120	43,99	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-O-35	40,23	<i>Metschnikowia viticola</i>	



Tabla 98. Identificación de la cepa NS-O-34 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
S-EM-LM-113	80,87	<i>S. cerevisiae</i>	*no se identifica consigo misma
NS-G-51	78,16	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
S-EM-PR-352	77,82	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-47	76,64	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-43	76,30	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-49	67,52	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-53	67,37	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-40	66,38	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
NS-G-33	65,44	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	

#### 4.2.2.2.12. Cepas especie *Zygosaccharomyces bailii*

Las dos cepas analizadas de la especie *Z. bailii* (NS-G-58 y NS-G63) al identificarlas con la librería creada, presentan un porcentaje de similitud del 100% consigo mismas y del 83 y 86% de una con la otra, respectivamente. En las figuras 84 y 85 se muestran los espectros de masas de las dos cepas, así como una ampliación de los mismos en dos zonas; en las tablas 99 y 100 figuran los porcentajes de similitud mayores al comparar estas dos cepas con todas las cepas de la librería.

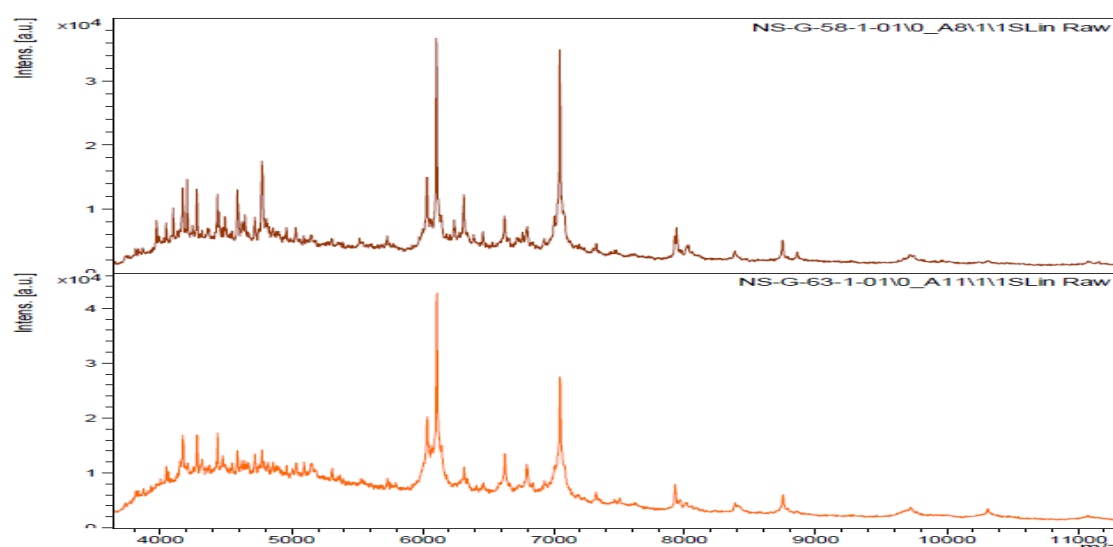


Figura 84. Espectros de masas de cepas de la especie *Z. bailii*. a) total

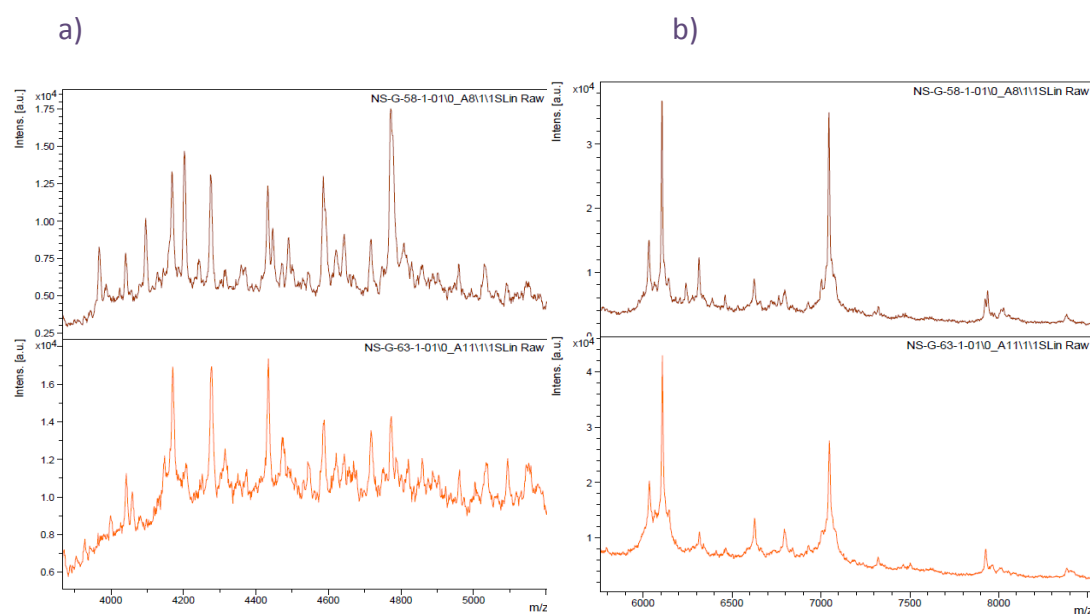


Figura 85. Espectros de masas de cepas de la especie *Z. bailii*. b) ampliación

Tabla 99. Identificación de la cepa NS-G-58 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-58	100,00	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	*correcto
NS-G-63	83,21	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	*correcto
NS-G-42	23,17	<i>S. cerevisiae</i>	
S-G-12	22,17	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-50	20,59	<i>S. cerevisiae</i>	
S-G-113	20,11	<i>S. cerevisiae</i>	
S-G-6	20,02	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-MA-83	19,96	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-PDC-100	19,85	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	

Tabla 100. Identificación de la cepa NS-G-63 y porcentaje de similitud con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-G-63	100,00	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	*correcto
NS-G-58	86,38	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	*correcto
NS-G-50	25,24	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-G-44	24,22	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-LS-305	23,36	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-PDC-132	22,76	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	
S-O-21	20,13	<i>S. cerevisiae</i>	
S-EM-MA-181	19,56	<i>S. cerevisiae</i>	
NS-PDC-178	19,36	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	

### 4.2.3. Validación de la librería

La validación de la librería se realiza analizando muestras de cepas de levaduras, cinco identificadas como de la especie *S. cerevisiae* y otras cinco especies de géneros no-*Saccharomyces*, aplicando el procedimiento especificado en el apartado 3.4.2.2, en un primer caso, a partir del punto 1) a 5 muestras de cada grupo (muestras de nuevo crecimiento); en un segundo caso, a partir del punto 3) a otras 5 de cada grupo (muestras congeladas) y adicionalmente, en un tercer caso, alícuotas de las mismas muestras procesadas en el segundo caso, se han depositado en la placa en pocillos alejados analizándose para verificar si la posición en la placa y la distancia al calibrante afecta a la identificación final.

Las cepas analizadas del grupo no-*Saccharomyces* son NS-EM-119, NS-O-11, NS-O-46, NS-PDC-99 y NS-PDC-262 y las del grupo *Saccharomyces* son la S-EM-CV-241, S-EM-CV-244, S-O-319, S-O-302 y S-O-320.

Los espectros se calibran, se convierten en formato ASCII y se procesan con el programa estadístico, obteniéndose el espectro de masas de cada cepa y un listado donde aparece el nombre de las posibles cepas identificadas en orden de semejanza decreciente. Los espectros de masas obtenidos por los tres procedimientos aplicados anteriormente, análisis de muestras de nuevo crecimiento, análisis de muestras congeladas 1, y análisis de muestras congeladas 2 (alícuotas de muestras congeladas 1, depositadas en otro pocillo) se presentan en el Anexo V.

Los resultados obtenidos para la validación de las cepas analizadas a partir de cepas de nuevo crecimiento, se presentan en la tabla 101, para las cepas de no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*, indicando los porcentajes de similitud con la especie identificada y la posición en la que aparece la identificación correcta para una cepa dada.

En los análisis de validación para las cepas del grupo no-*Saccharomyces*, a partir de cepas de nuevo crecimiento, se ha conseguido identificar a nivel de especie en las cinco

cepas analizadas e identificar a nivel de cepa en dos (NS-O-46 y NS-PDC-99) de las cinco cepas, mientras que en otras dos (NS-O-11 y NS-EM-119), se obtienen unos porcentajes de similitud elevados del 72 y 83% con la cepa en estudio, apareciendo la cepa correcta en posición 2 y 3 del listado. Por lo que respecta a la cepa NS-PDC-262, se ha conseguido identificar a nivel de especie pero no de cepa, por lo que parece existir un error experimental ya que el porcentaje de similitud es muy bajo, concretamente del 10%.

Tabla 101. Cepas analizadas partiendo de nuevo crecimiento de levadura. Identificación y porcentaje de similitud

Cepa en estudio	Especie	% Similitud con el 1º candidato	Cepa 1º Identificación	Especie 1º Identificación	Posición cepa estudio	% Similitud con cepa estudio
<i>no-Saccharomyces (analizados a partir de nuevo crecimiento de levadura)</i>						
NS-EM -119	<i>L. thermotolerans</i>	86,55	NS-O-46	<i>L. thermotolerans</i>	3	83,82
NS-O-11	<i>W. anomalus</i>	77,83	NS-O-14	<i>W. anomalus</i>	2	72,01
NS-O-46	<i>L. thermotolerans</i>	88,32	NS-O-46	<i>L. thermotolerans</i>	1	-
NS-PDC-99	<i>K. marxianus</i>	73,55	NS-PDC-99	<i>K. marxianus</i>	1	-
NS-PDC-262	<i>C. amyloletus</i>	93,56	NS-PDC-248	<i>C. amyloletus</i>	68	10,27
<i>Saccharomyces (analizados a partir de nuevo crecimiento de levadura)</i>						
S-EM- 241	<i>S. cerevisiae</i>	88,31	S-G-37	<i>S. cerevisiae</i>	38	75,51
S-EM- 244	<i>S. cerevisiae</i>	86,60	S-EM-PR-360	<i>S. cerevisiae</i>	41	60,55
S-O-319	<i>S. cerevisiae</i>	89,18	S-G-6	<i>S. cerevisiae</i>	56	69,53
S-O-302	<i>S. cerevisiae</i>	89,53	S-O-290	<i>S. cerevisiae</i>	50	72,61
S-O-320	<i>S. cerevisiae</i>	73,19	S-O-290	<i>S. cerevisiae</i>	49	56,30

La identificación a nivel de especie en cepas de *S. cerevisiae* ha sido correcta en todas las cepas analizadas; sin embargo, la identificación a nivel de cepa en la especie *S. cerevisiae* resulta más complicada debido a la gran similitud entre los espectros de masas de las diferentes cepas de esta especie, que es igual a lo que ocurre en caso de partir de cepas congeladas. De las cinco cepas analizadas de *S. cerevisiae* en ningún caso la cepa en estudio aparece en el listado de la librería como primera candidata, encontrándose la cepa correcta en posiciones desde la 38 hasta la 56 y con unos porcentajes de similitud entre el 56 y 75%. Esto puede ser debido a que cuando se parte de un crecimiento nuevo de la cepa existen muchas variables a tener en cuenta que pueden hacer variar el perfil del espectro de masas. Como trabajo futuro se pretende conseguir agrupar las cepas de *Saccharomyces* en clúster para poder hacer similitudes entre ellas.

En la tabla 102, se presentan los resultados obtenidos en la validación para las cepas en estudio, partiendo de cepas congeladas, indicando los porcentajes de similitud con la especie identificada y la posición en la que aparece la identificación correcta para la cepa en estudio.

Tabla 102. Cepas analizadas partiendo de muestra congelada 1. Identificación y porcentaje de similitud

Cepa en estudio	Especie en estudio	% Similitud con 1º cand.	Cepa 1º Identificación	Especie 1º Identificación	Posición cepa estudio	% Similitud con cepa estudio
<i>no-Saccharomyces (analizados a partir de levadura congelada ya analizada anteriormente)</i>						
<b>NS-EM-119</b>	<i>L. thermotolerans</i>	98,50	NS-EM -119	<i>L. thermotolerans</i>	1	-
<b>NS-O-11</b>	<i>W. anomalus</i>	88,19	NS-O-11	<i>W. anomalus</i>	1	-
<b>NS-O-46</b>	<i>L. thermotolerans</i>	95,86	NS-EM -119	<i>L. thermotolerans</i>	2	94,55
<b>NS-PDC-99</b>	<i>K. marxianus</i>	99,37	NS-PDC-99	<i>K. marxianus</i>	1	-
<b>NS-PDC-262</b>	<i>C. amyloletus</i>	98,97	NS-PDC-262	<i>C. amyloletus</i>	1	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (analizados a partir de levadura congelada ya analizada anteriormente)</i>						
<b>S-EM-241</b>	<i>S. cerevisiae</i>	96,85	S-O-47	<i>S. cerevisiae</i>	14	93,97
<b>S-EM-244</b>	<i>S. cerevisiae</i>	94,23	S-EM- 244	<i>S. cerevisiae</i>	1	-
<b>S-O-319</b>	<i>S. cerevisiae</i>	94,64	S-EM-81	<i>S. cerevisiae</i>	16	85,91
<b>S-O-302</b>	<i>S. cerevisiae</i>	94,79	S-O-290	<i>S. cerevisiae</i>	26	91,35
<b>S-O-320</b>	<i>S. cerevisiae</i>	96,85	S-O-47	<i>S. cerevisiae</i>	6	95,05

De acuerdo con los resultados que se muestran en la tabla 102, en el caso de las cepas *no-Saccharomyces*, cuando se parte de una muestra congelada, analizada anteriormente para crear los espectros de la librería, la identificación a nivel de especie ha sido posible en las cinco cepas analizadas; por otra parte, la identificación a nivel de cepa ha sido posible en cuatro de las cinco cepas, ya que aparecen como primera opción en el listado. En la identificación de la cepa NS-O-46, ésta no aparece como primera opción en el listado, sino como segunda, con un porcentaje de similitud del 94.55%, apareciendo como primera candidata en el listado de la librería una cepa diferente de la misma especie *L. thermotolerans*, con un porcentaje de similitud del 95.86%; por tanto; se considera satisfactoria la identificación, ya que las diferencias entre ambas especies son mínimas.

Por lo que respecta a la identificación de especie en cepas de *S. cerevisiae* ha sido igualmente positiva en todas las cepas analizadas; sin embargo, la identificación a nivel de cepa en la especie *S. cerevisiae* es menos satisfactoria debido a la enorme similitud entre los

espectros de masas de la diferentes cepas de esta especie. De las cinco cepas analizadas para la validación de *S. cerevisiae*, solamente una de ellas, la cepa S-EM-244, aparece como primera candidata en su listado de la librería, con un porcentaje de similitud del 94.23%. Las otras cuatro cepas analizadas aparecen en posiciones más bajas del listado, entre la posición 6 y 26, con unos porcentajes de similitud entre las cepas en el margen 95.05-85.91%; esto demuestra que efectivamente las cepas son similares, por lo que, la dificultad de identificación a nivel de cepa radica en la gran similitud entre las diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

Los resultados obtenidos partiendo de alícuotas, tras el procesamiento de muestras congeladas, depositadas en pocillos alejados en la placa MALDI y con diferentes distancias al calibrante, se muestran en la tabla 103; estos resultados son similares a los anteriores, tanto para las cepas de no-Saccharomyces como para las de Saccharomyces, ya que los porcentajes de similitud entre las cepas analizadas y las identificadas se encuentran en torno a los mismos porcentajes. Esto indica que la posición de la muestra en la placa y su distancia al calibrante no afectan prácticamente a la identificación.

Tabla 103. Cepas analizadas partiendo de muestras congeladas 2 (diferente posición en placa MALDI). Identificación y porcentaje de similitud

Cepa en estudio	Especie en estudio	% Similitud con el 1º cand.	Cepa 1º Identificación	Especie 1º Identificación	Posición cepa estudio	% Similitud con cepa estudio
<b>no-Saccharomyces (analizados a partir de nuevo crecimiento de levadura)</b>						
NS-EM -119	<i>L. thermotolerans</i>	99,31	NS-EM-VR-119	<i>Lachancea thermotolerans</i>	1	-
NS-O-11	<i>W. anomalus</i>	95,64	NS-O-11	<i>Metschnikowia viticola</i>	1	-
NS-O-46	<i>L. thermotolerans</i>	99,64	NS-EM-VR-119	<i>Lachancea thermotolerans</i>	6	98,98
NS-PDC-99	<i>K. marxianus</i>	99,37	NS-PDC-99	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	-
NS-PDC-262	<i>C. amyloletus</i>	95,57	NS-PDC-262	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	1	-
<b>Saccharomyces (analizados a partir de nuevo crecimiento de levadura)</b>						
S-EM- 241	<i>S. cerevisiae</i>	100,00	S-EM-CV-244	<i>S. cerevisiae</i>	3	99,99
S-EM- 244	<i>S. cerevisiae</i>	98,27	S-EM-CV-244	<i>S. cerevisiae</i>	1	-
S-O-319	<i>S. cerevisiae</i>	99,39	S-EM-MA-81	<i>S. cerevisiae</i>	25	94,10
S-O-302	<i>S. cerevisiae</i>	98,62	S-O-320	<i>S. cerevisiae</i>	44	85,79
S-O-320	<i>S. cerevisiae</i>	99,07	S-O-320	<i>S. cerevisiae</i>	1	-

De acuerdo con los resultados de las tablas 101, 102 y 103, la cepa NS-PDC-99 es identificada en los tres casos como primera opción por lo que parece que es la cepa más fácilmente identificable.

A diferencia de los tres sistemas comerciales de espectrometría de masas MALDI –TOF MS comentados en la tabla 3, del Capítulo 1. Introducción, que disponen de librería y software específicos para la identificación de microorganismos, y no se ven libres de falsas identificaciones (De Carolis, 2014), en este trabajo se ha empleado un equipo de Bruker que carece de este tipo software y se ha creado una librería propia que ha permitido la identificación y clasificación de especies de levaduras, disminuyendo de esta forma los costes de análisis.

En principio, no se han fijado porcentajes de similitud por encima de los cuales se asegure la identificación fiable a nivel de género, especie o cepa, debido a que como se puede ver en la tabla 101, existen casos en la validación, en los que, por ejemplo, la cepa NS-PDC-99 aparece en el listado correctamente identificada como primera candidata y su porcentaje de similitud con el espectro de la librería es de un 73,55%, mientras que la cepa NS-EM-119 aparece identificada como tercera candidata en la lista con un porcentaje de similitud del 83,82%.

Cabe resaltar que el procedimiento aplicado en este trabajo consistente en manejar el porcentaje de similitud de la cepa en estudio con el resto de entradas de la librería, es mucho más sencillo y visual que las metodologías disponibles en la bibliografía relacionada directamente con el lenguaje aplicado en las librerías comerciales. La mayoría tienen en cuenta la puntuación y el índice de consistencia o solamente la puntuación. Entre los que tienen en cuenta la puntuación y el índice de consistencia se mencionan dos propuestas; Moussaoui et al. establecieron que una identificación era válida si se obtenía una puntuación  $\geq 1,400$  en el primer microorganismo y la especie coincidía en las cuatro primeras propuestas de identificación del listado (Moussaoui, 2010); por su parte, Schubert et al. propusieron una identificación como válida cuando se obtenía una puntuación  $\geq 1,500$  en el primer microorganismo y la especie coincidía en las tres primeras propuestas de

identificación del listado (Schubert, 2011). En cuanto a los criterios que únicamente tienen en cuenta la puntuación obtenida en la primera identificación del listado, se citan a modo de ejemplo dos propuestas; Lindsay et al. establecieron que una puntuación  $\geq 2,000$  indicaba una identificación a nivel de especie, entre 1,700 y 1,900 indicaba una identificación a nivel de género y una puntuación menor 1,700 se consideraba una identificación fallida (Lindsay, 2010); de acuerdo con otra propuesta, La Scola y Raoult establecieron que un microorganismo era identificado correctamente mediante MALDI-TOF MS cuando, realizadas cuatro identificaciones de una misma muestra, la especie con mayor puntuación (la primera de la lista) coincidía en todas ellas y como mínimo en dos identificaciones se obtenía una puntuación  $\geq 1,900$ , o en las cuatro se alcanzaba una puntuación  $\geq 1,200$  (La Scola, 2009).

#### **4.2.4. Diferenciación e identificación de dos especies del género *Metschnikowia*. Especies *M. fructicola* y *M. pulcherrima***

Con objeto de diferenciar e identificar dos especies íntimamente relacionadas del género *Metschnikowia*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*, que son muy difíciles de distinguir aplicando técnicas clásicas y moleculares, se han analizado mediante MALDI-TOF MS un conjunto de varias cepas de ambas especies y se han comparado con los resultados de su respectiva cepa Tipo de colección.

La aplicación de técnicas moleculares para esta diferenciación no siempre produce resultados satisfactorios. Concretamente, Kurtzman et al. (2001) afirman haber podido distinguir estas dos especies en base al 26S ya que se diferencian en un 2,2%, pero sin embargo, Spiczki et al. (2013) dicen que esas diferencias tan pequeñas pueden deberse a errores en la PCR o a la suciedad de las bases de datos, por lo que existe bastante controversia en la interpretación de los resultados y falta de criterios consistentes. (Guzmán et al., 2013) son los únicos autores que parece han conseguido realizar una taxonomía más concluyente en cepas de levaduras del género *Metschnikowia*; describen los cebadores del gen EF2 (*Elongation Factor 2*) y se aproximan más que a autores anteriores al objetivo de diferenciación de estas dos especies.



En la tabla 104, se presentan las muestras analizadas de las cepas Tipo y las cepas autóctonas de *M. fructicola* y *M. pulcherrima*.

Los espectros de masas sintéticos de las cepas analizadas de *M. fructicola* y *M. pulcherrima* se presentan en el Anexo III.

Tabla 104. Cepas Tipo y cepas de muestra analizadas de *M. fructicola* y *M. pulcherrima*

ESPECIE	CEPA	BODEGA	FINCA	AÑO
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Tipo- CBS8853	-	-	-
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NS-EM-113	Emilio Moro	Valderramiro	2014
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NS-O-29	Ossian	L20	2013
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NS-O-61	Ossian	Alto Camino	2013
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NS-O-69	Ossian	Alto Camino	2013
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NS-O-23	Pago de Carraovejas	PDC6 baja	2013
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NS-PDC-191	Pago de Carraovejas	PSD-063	2014
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NS-PDC-193	Pago de Carraovejas	PSD-063	2014
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NS-PDC-194	Pago de Carraovejas	PSD-063	2014
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NS-PDC-195	Pago de Carraovejas	PSD-063	2014
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NS-PDC-207	Pago de Carraovejas	PSD-063	2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Tipo- CECT11202	-	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NS-EM-111	Emilio Moro	Valderramiro	2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NS-O-221	Ossian	Alto Camino	2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NS-O-223	Ossian	Alto Camino	2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NS-O-235	Ossian	Alto Camino	2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NS-O-88	Ossian	Alto Camino	2013
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NS-PDC-141	Pago de Carraovejas	PSD-036 PSTM2	2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NS-PDC-143	Pago de Carraovejas	PSD-036 PSTM2	2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NS-PDC-147	Pago de Carraovejas	PSD-036 PSTM2	2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NS-PDC-149	Pago de Carraovejas	PSD-036 PSTM2	2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NS-PDC-150	Pago de Carraovejas	PSD-036 PSTM2	2014

#### 4.2.4.1. Análisis de cepas TIPO de *M. fructicola* y *M. pulcherrima*

Se han comparado los espectros de masas de dos cepas Tipo del género *Metschnikowia*, *M. fructicola* y *M. pulcherrima* (ver figura 86, a) y b), respectivamente), observándose diferencias en dos zonas del espectro para ambas especies, en torno a las relaciones masa/carga ( $m/z$ ) 6800 (iones aproximadamente a 6815 y 6865) y 3400 (iones aproximadamente a 3405 y 3430); los iones de la zona de 6800 son claramente más intensos que los de la zona de 3400.

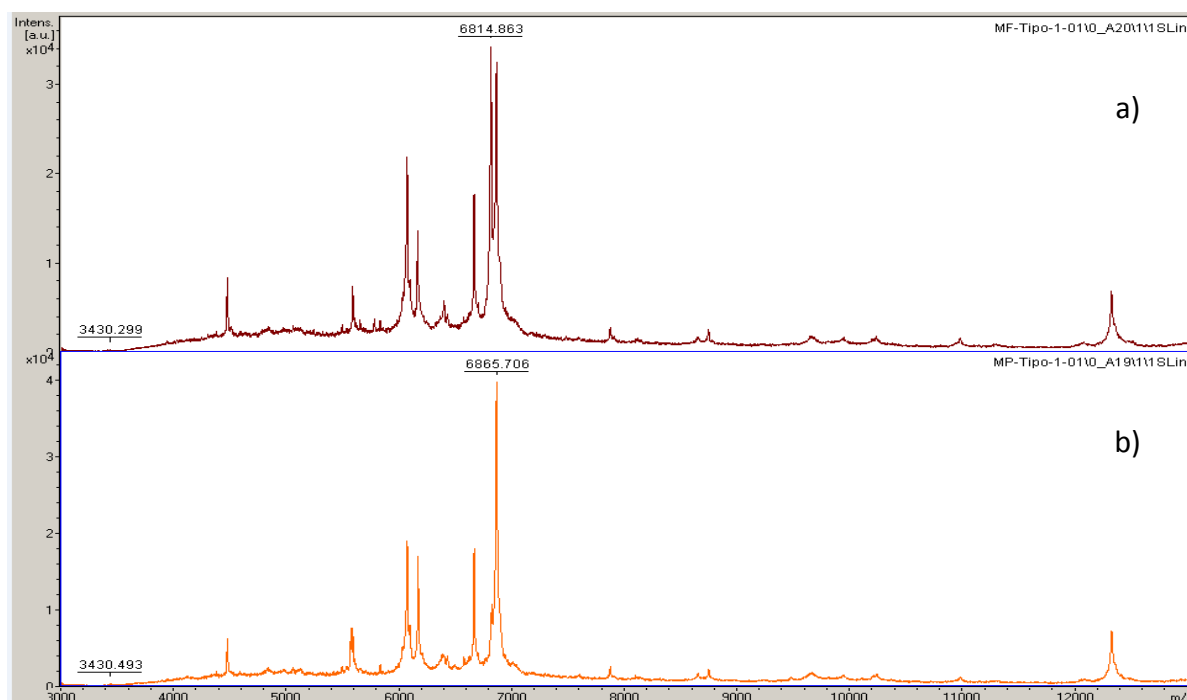


Figura 86. Comparación de los espectros de masas de *M. fructicola* Tipo- CBS8853 (a) y *M. pulcherrima* Tipo- CECT11202 (b)

Como se observa en la figura 87, en torno a la relación  $m/z$ , 6800 del espectro de masas, la cepa Tipo- CBS8853 de *M. fructicola* presenta dos iones (aproximadamente a  $m/z$  6815 y 6865), mientras que en la cepa Tipo- CECT11202 de *M. pulcherrima* solo aparece un ión (a  $m/z$  6865), lo cual se visualiza claramente en la ampliación de esta zona del espectro (figura 87, zoom zona 6800).

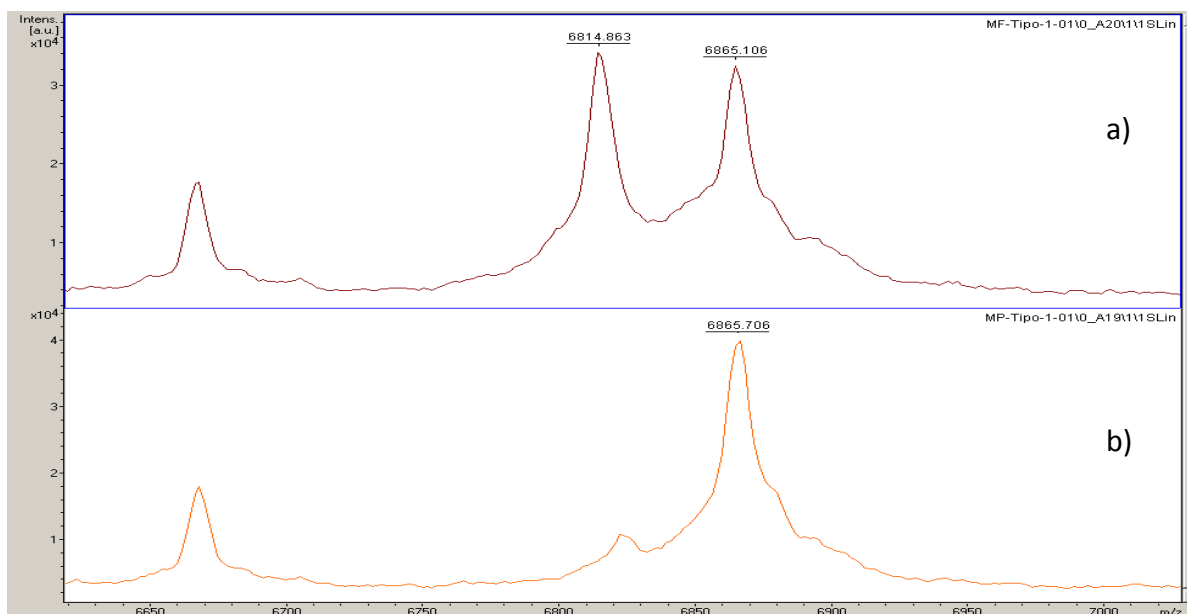


Figura 87. Ampliación del espectro de masas en la zona relación  $m/z$  6800 - Comparación de los espectros de masas de *M. fructicola* (a) y *M. pulcherrima* Tipo- CECT11202 (b)

De forma análoga, en la zona de  $m/z$  3400 del espectro de masas, la cepa *Tipo- CBS8853* de *M. fructicola* presenta dos iones (aproximadamente a  $m/z$  4405 y 4430), mientras que en la cepa *Tipo- CECT11202* de *M. pulcherrima* aparece un solo ión a  $m/z$  3430; igualmente esta diferencia se visualiza en la ampliación de la zona en la figura Z (figura 88, zoom zona 3400).



Figura 88. Ampliación del espectro de masas en la zona relación  $m/z$  3400 - Comparación de los espectros de masas de *M. fructicola* Tipo- CBS8853 (a) y *M. pulcherrima* Tipo- CECT11202 (b)

En la figura 89, se presenta el espectro de masas de la cepa *Tipo- CBS8853* *M. fructicola* generado a partir del formato ASCII con el programa R, donde se marcan los iones del espectro de masas más representativos mediante círculos rojos y su proyección en forma de líneas sobre el eje X.

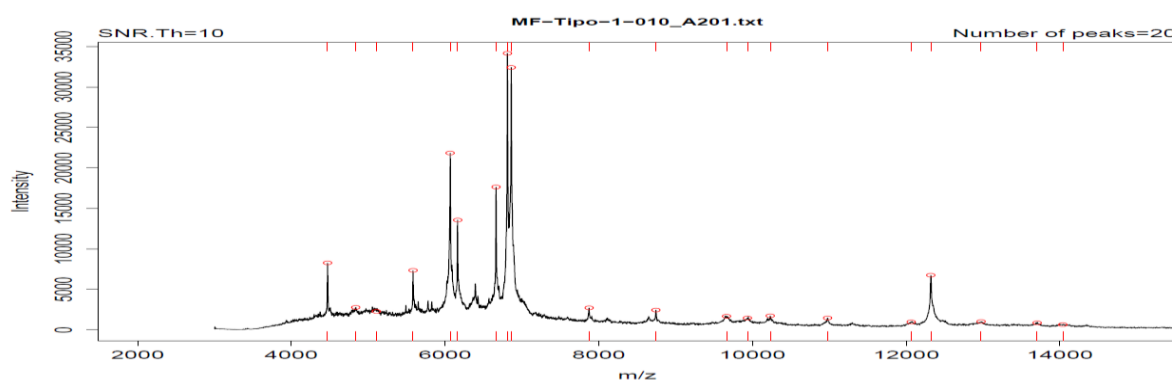


Figura 89. Espectro de masas de *M. fructicola* Tipo- CBS8853 generado por el programa R

Igualmente, en la figura 90, se presenta el espectro de masas de la cepa *Tipo- M. pulcherrima CECT11202* generado a partir del formato ASCII con el programa R, donde se marcan los iones del espectro de masas más representativos mediante círculos rojos y su proyección en forma de líneas sobre el eje X.

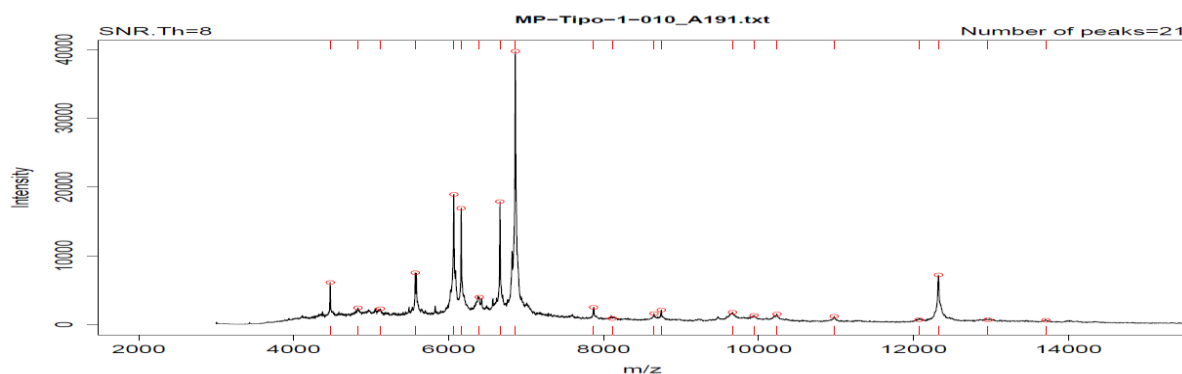


Figura 90. Espectro de masas de *M. pulcherrima Tipo- CECT11202* generado por el programa R

#### 4.2.4.2. Comparación de cepas autóctonas de muestra con cepas Tipo

##### 4.2.4.2.1. *M. fructicola*

Se han analizado 10 cepas de *M. fructicola* mediante MALDI-TOF MS (ver tabla 114) que estaban identificadas previamente por métodos clásicos y moleculares y se han comparado con la cepa *M. fructicola Tipo- CBS8853* de colección con fines de identificación; los espectros de masas de la cepa Tipo y cepas autóctonas analizadas se presentan en la figura 91.

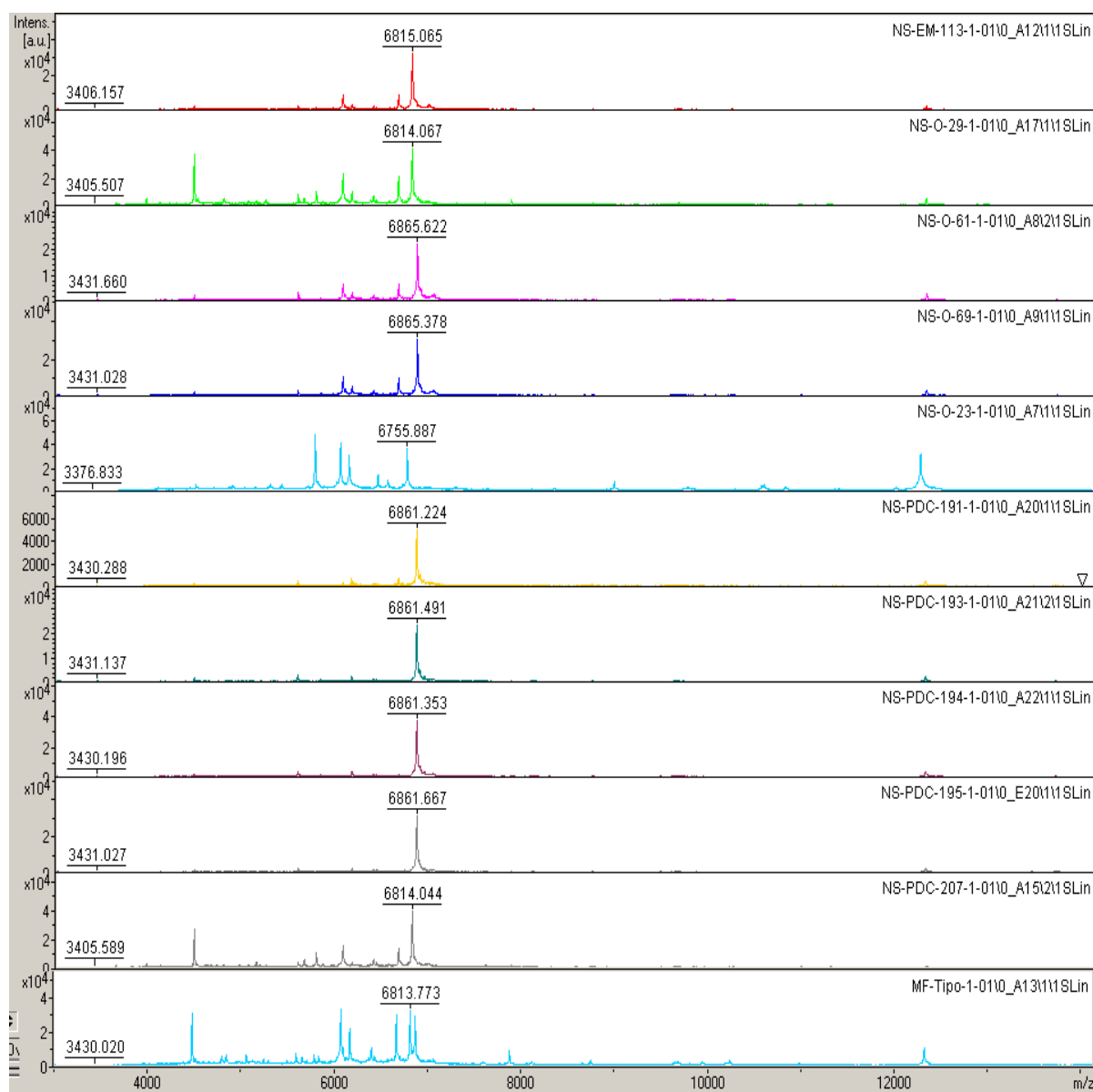


Figura 91. Comparación de espectro de masas de *M. fructicola* Tipo- CBS8853 con espectros de masas de posibles cepas de *M. fructicola*

Cabe resaltar, que en la zona de relación  $m/z$  6800 del espectro de masas, en la cepa Tipo aparecen dos iones aproximadamente a 6815 y 6865, mientras que en todas las cepas de muestras analizadas, excepto en la cepa NS-O-23 (en esta cepa aparece un único ion a 6755 en esta zona, que no coincide con el resto de cepas), aparece un único ión, si bien este ión coincide unas veces con el primer ión y otras veces con el segundo de la cepa Tipo (ver figura 92-ampliación).

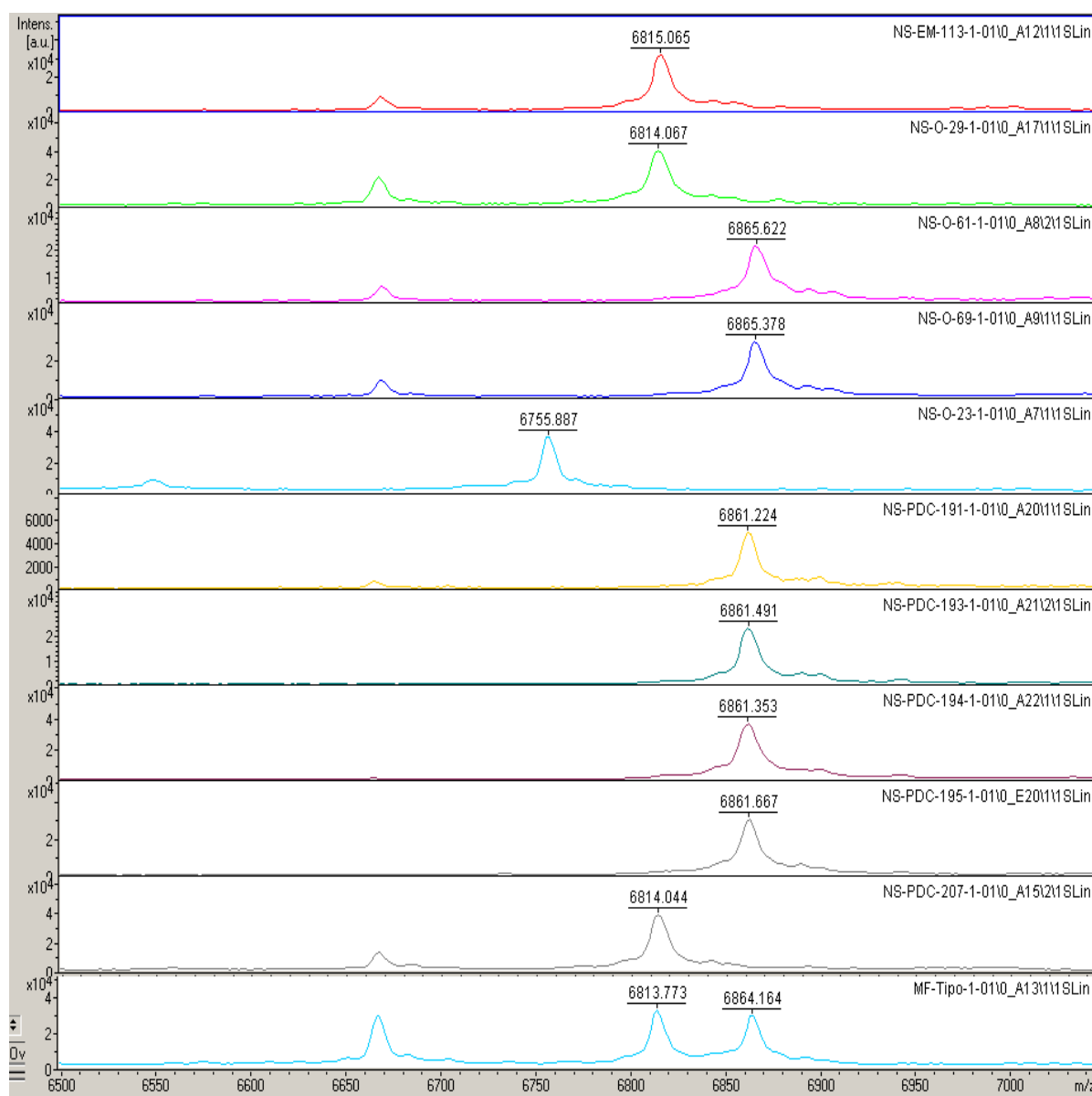


Figura 92. Ampliación del espectro de masas en la zona de relación  $m/z$  6800 - Comparación de *M. fructicola* Tipo- CBS8853 con posibles cepas de *M. fructicola*

Por otra parte, como muestra la figura 93, en la zona de  $m/z$  3400 del espectro de masas aparecen dos iones en la cepa Tipo y un solo ión en todas las cepas analizadas, excepto en la cepa NS-O-23(en esta cepa aparece un único ion a 3376 en esta zona, que no coincide con el resto de cepas), repitiéndose el mismo patrón de comportamiento que en la zona de 6800, es decir, el ión de las cepas analizadas unas veces coincide con el primer ión de la cepa Tipo y otras veces con el segundo.

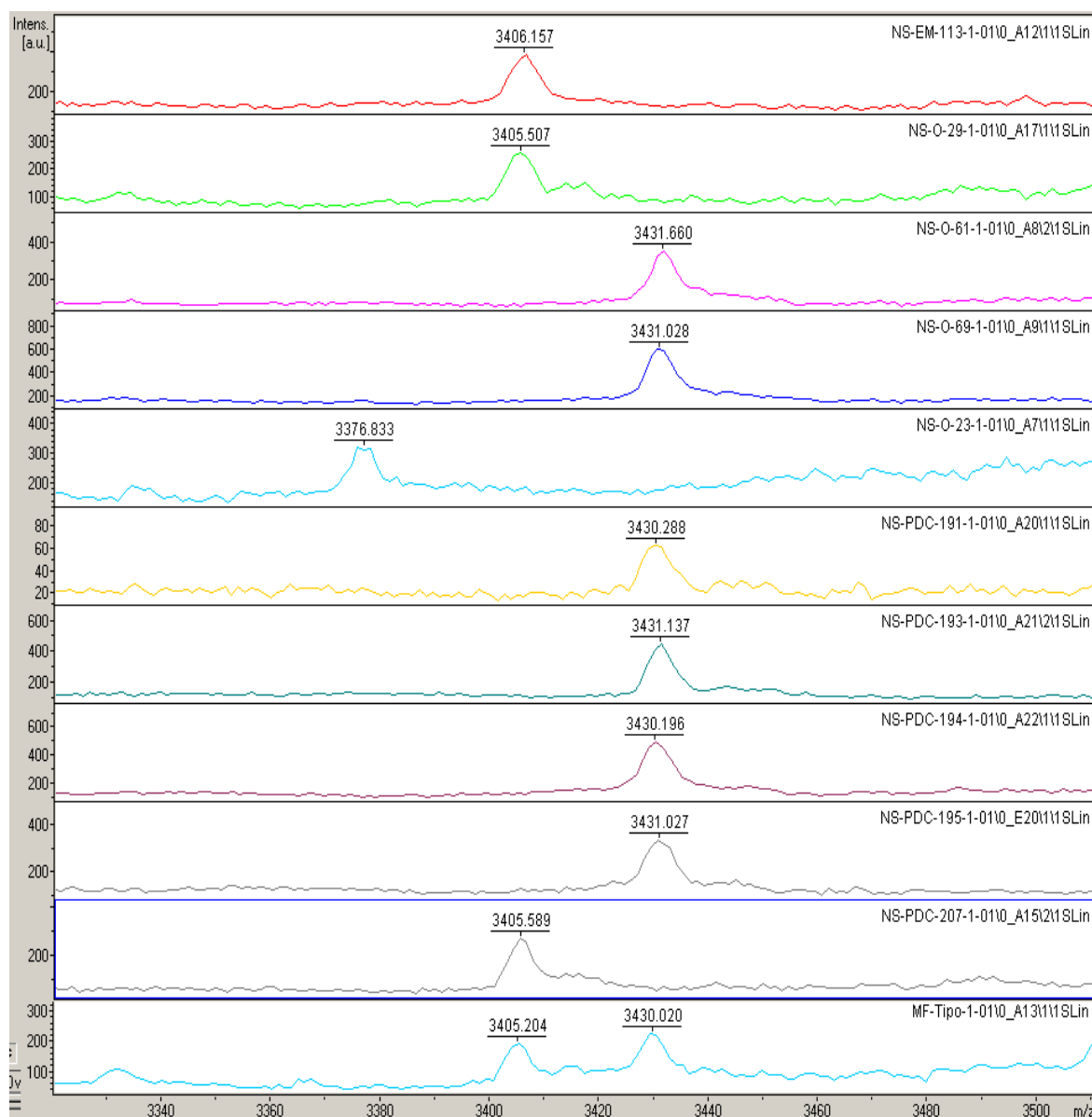


Figura 93. Ampliación de la zona relación  $m/z$  3400 - Comparación de *M. fructicola* Tipo- CBS8853 con posibles cepas de *M. fructicola*

Estos resultados parecen indicar que las cepas analizadas corresponden a *M. pulcherrima* y no a *M. fructicola*, asignación que es contraria a la realizada mediante técnicas clásicas y moleculares.

En el caso de la cepa NS-O-23, el perfil del espectro de masas es completamente diferente al resto de muestras (ver figuras 91, 92 y 93) y al realizar la identificación utilizando la librería creada, se obtienen los resultados presentados en la tabla 105, en la que se recoge el listado únicamente de los 9 candidatos con mayor similitud; al identificar esta cepa

con la librería, se observa que el mayor porcentaje de similitud corresponde con una cepa de la especie *Hanseniaspora uvarum*; también destacar que los siguientes porcentajes de similitud la mayoría siguen correspondiendo a cepas identificadas como *Hanseniaspora uvarum*. Esto es debido a un error en la selección de las cepas para el estudio de diferenciación de *M. fructicola* y *M. pulcherrima* ya que NS-O-23 no se corresponde con *M. fructicola* sino con *Hanseniaspora uvarum* como se puede ver en la tabla 6 (listado de cepas general). Cabe destacar que la segunda cepa con mayor porcentaje de coincidencia se corresponda con una cepa de la especie *S. cerevisiae*, se ha estudiado también, el porcentaje de coincidencia de esta especie con el resto de cepas de la librería mostrándose los datos en la tabla 106 (se presentan únicamente los nueve primeros candidatos de la tabla). Se observa que a partir del segundo porcentaje de similitud aparecen cepas identificadas como *H. uvarum*, por lo que se descarta la identificación como *S. cerevisiae*.

Tabla 105. Porcentajes de similitud de NS-O-23 con todas las cepas de la librería.

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-O-23	100	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	*correcto
S-EM-LM-266	97,45	<i>S. cerevisiae</i> *descartada	
NS-EM-VR-101	96,47	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-EM-VR-125	96,14	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-O-57	95,19	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-EM-CV-1	94,45	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-EM-CV-25	87,89	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-PDC-105	87,28	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-PDC-262	81,23	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	

Tabla 106. Porcentajes de similitud de S-EM-266 con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
S-EM-LM-266	100	<i>S. cerevisiae</i>	*descartada
NS-O-57	96,13	<i>Hanseniaspora uvarum</i> *correcto	
NS-EM-VR-125	95,52	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-EM-VR-101	94,14	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-EM-CV-1	93,57	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-O-23	93,29	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-O-157	87,34	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-EM-CV-25	85,58	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-PDC-105	85,19	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	



En el caso de la cepa *Tipo- CBS8853 M. fructicola*, al compararla con el resto de cepas de la librería (ver tabla 107, con un listado de los diez primeros candidatos), la máxima similitud es consigo misma (100% de coincidencia), sin embargo la segunda candidata corresponde a una cepa de *M. pulcherrima*, apareciendo la primera cepa *M. fructicola* en la posición número 5 con un porcentaje de similitud del 96%. Esto puede ser debido a que las dos especies presentan un espectro de masas con perfiles muy similares, lo que dificulta su identificación precisa. No obstante, se debe dar prioridad a la diferenciación de estas dos especies atendiendo a las diferencias existentes en los iones diferenciales comentados, es decir, en torno a la relación m/z, 6800 y 3400 del espectro de masas de ambas especies.

Tabla 107. Porcentajes de similitud de *M. fructicola Tipo- CBS8853* con todas las cepas de la librería

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>MF- Tipo- CBS8853</b>	100,00	<i>Metschnikowia fructicola Tipo- CBS8853</i>	<i>*correcto</i>
<b>NS-PDC-147</b>	97,53	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-PDC-143</b>	96,62	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-PDC-141</b>	96,31	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-PDC-14</b>	96,00	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
<b>NS-PDC-149</b>	95,12	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>MP- Tipo- CECT11202</b>	93,61	<i>Metschnikowia pulcherrima Tipo- CECT11202</i>	
<b>NS-O-223</b>	93,52	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-O-221</b>	93,40	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-PDC-261</b>	93,12	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	

#### 4.2.4.2.2. *M. pulcherrima*

Siguiendo la metodología del apartado anterior, se han analizado 10 cepas de *M. pulcherrima* mediante MALDI-TOF MS ya identificadas por métodos moleculares, y se han comparado con la cepa Tipo de colección de *M. pulcherrima*; los espectros de masas de la cepa Tipo y cepas autóctonas analizadas se presentan en la figura 94.

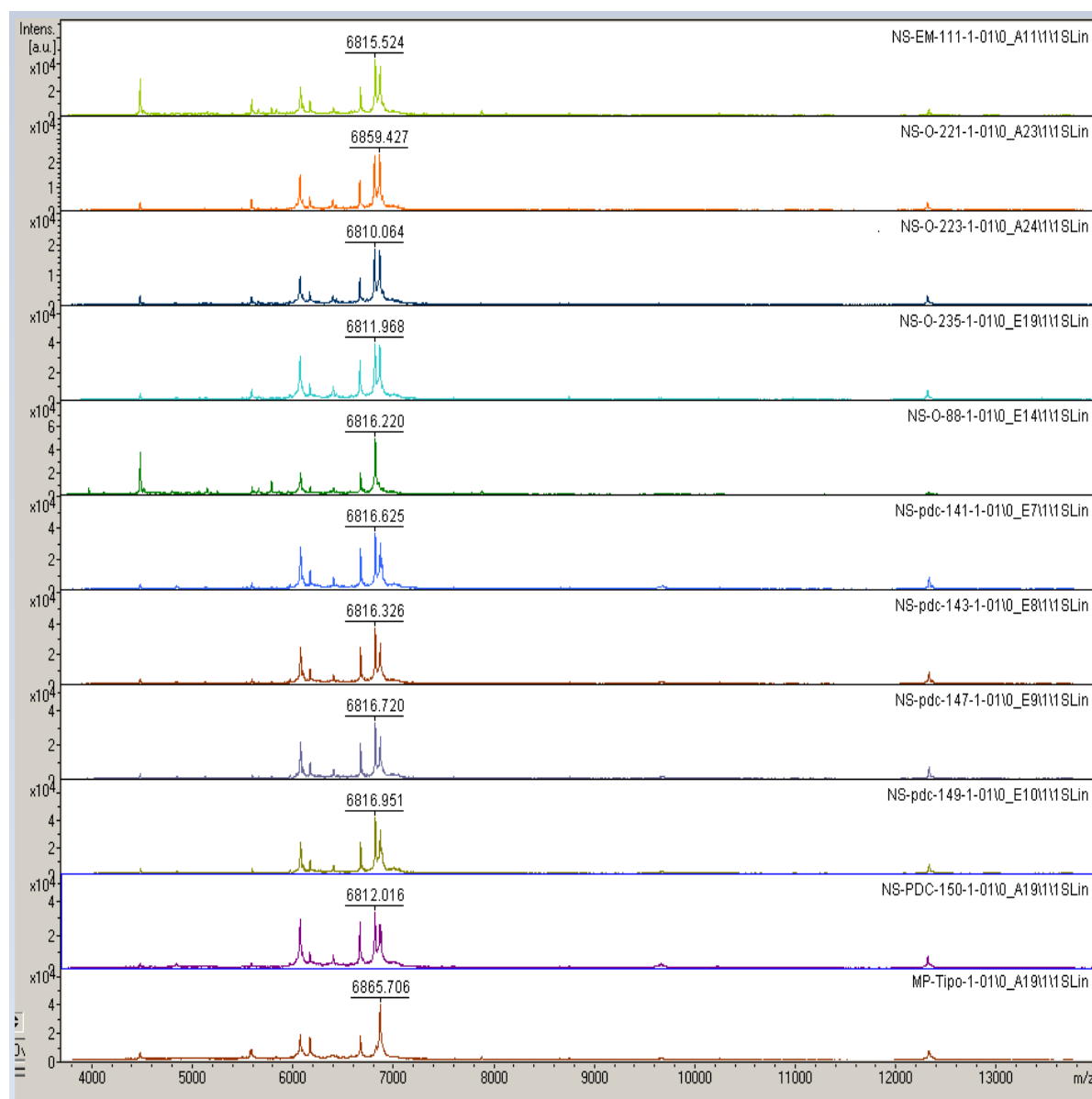


Figura 94. Comparación de espectro de masas de *M. pulcherrima* Tipo- CECT11202 con espectros de masas de posibles cepas de *M. pulcherrima*

Como aspecto más relevante, cabe destacar que en la zona de relación  $m/z$  6800 del espectro de masas de la cepa Tipo aparece un ion, aproximadamente a 6865 mientras que en todos los espectros de masas de las cepas de muestras analizadas, excepto en la cepa NS-PDC-88 (que solo aparece el ión 6815), aparecen dos iones, aproximadamente a 6815 y 6865; en este caso el ion a 6865 en el espectro de masas de la cepa Tipo coincide con el segundo ion en los espectros de masas de las muestras analizadas (Ver figura 95).

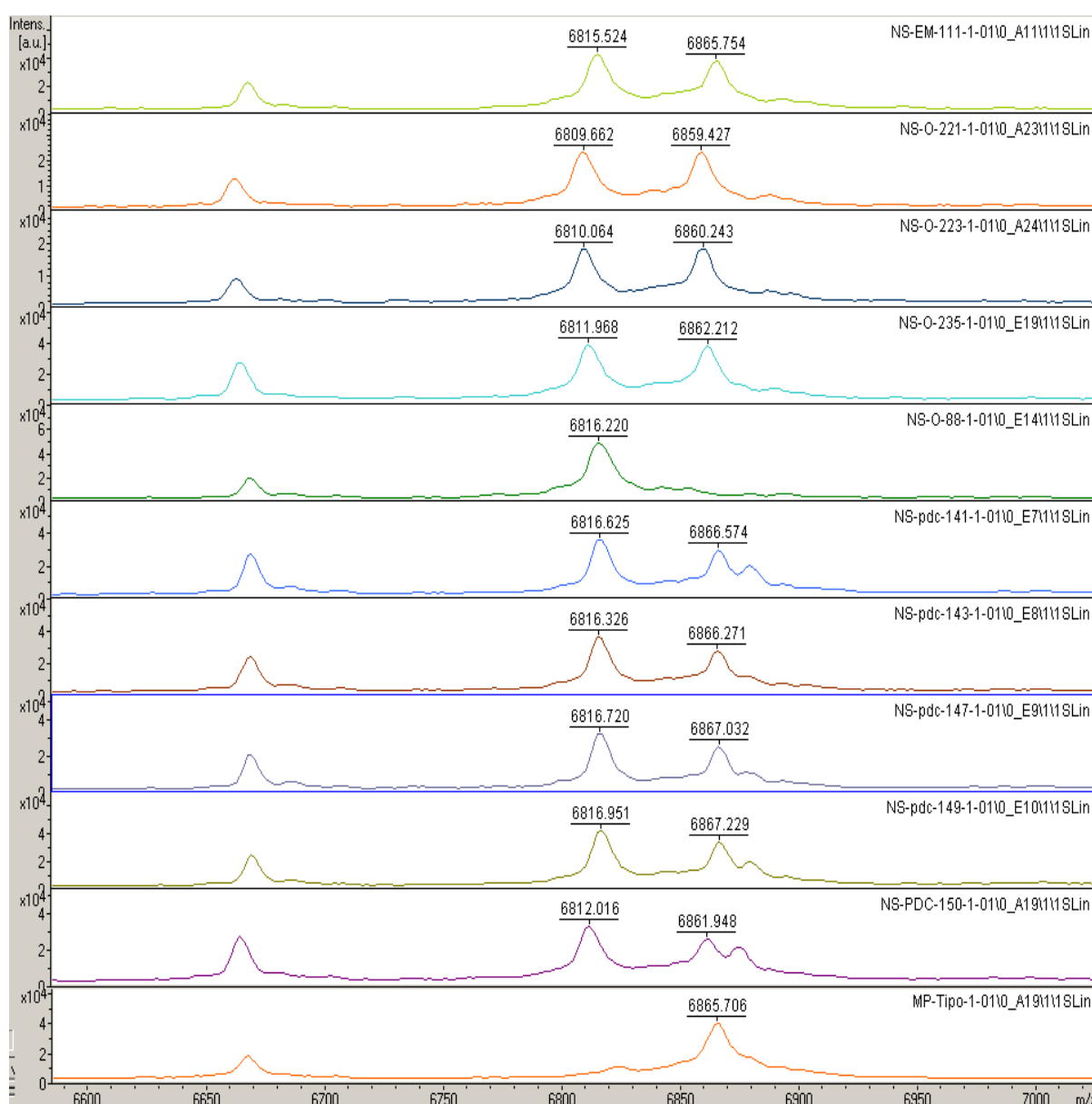


Figura 95. Ampliación de los espectros de masas en la zona relación  $m/z$  6800 - Comparación de *M. pulcherrima* Tipo-CECT11202 con posibles cepas de *M. pulcherrima*

En la zona de relación  $m/z$  3400 del espectro de masas, aparece un ión a aproximadamente 3430 en la cepa Tipo y dos iones a aproximadamente 3405 y 3430 en todas las cepas de muestras analizadas, excepto en la cepa NS-O-88 (que solo aparece el ión 3405), coincidiendo el ión 3430 de la cepa Tipo con el segundo ión de las cepas de muestra (ver figura 96).

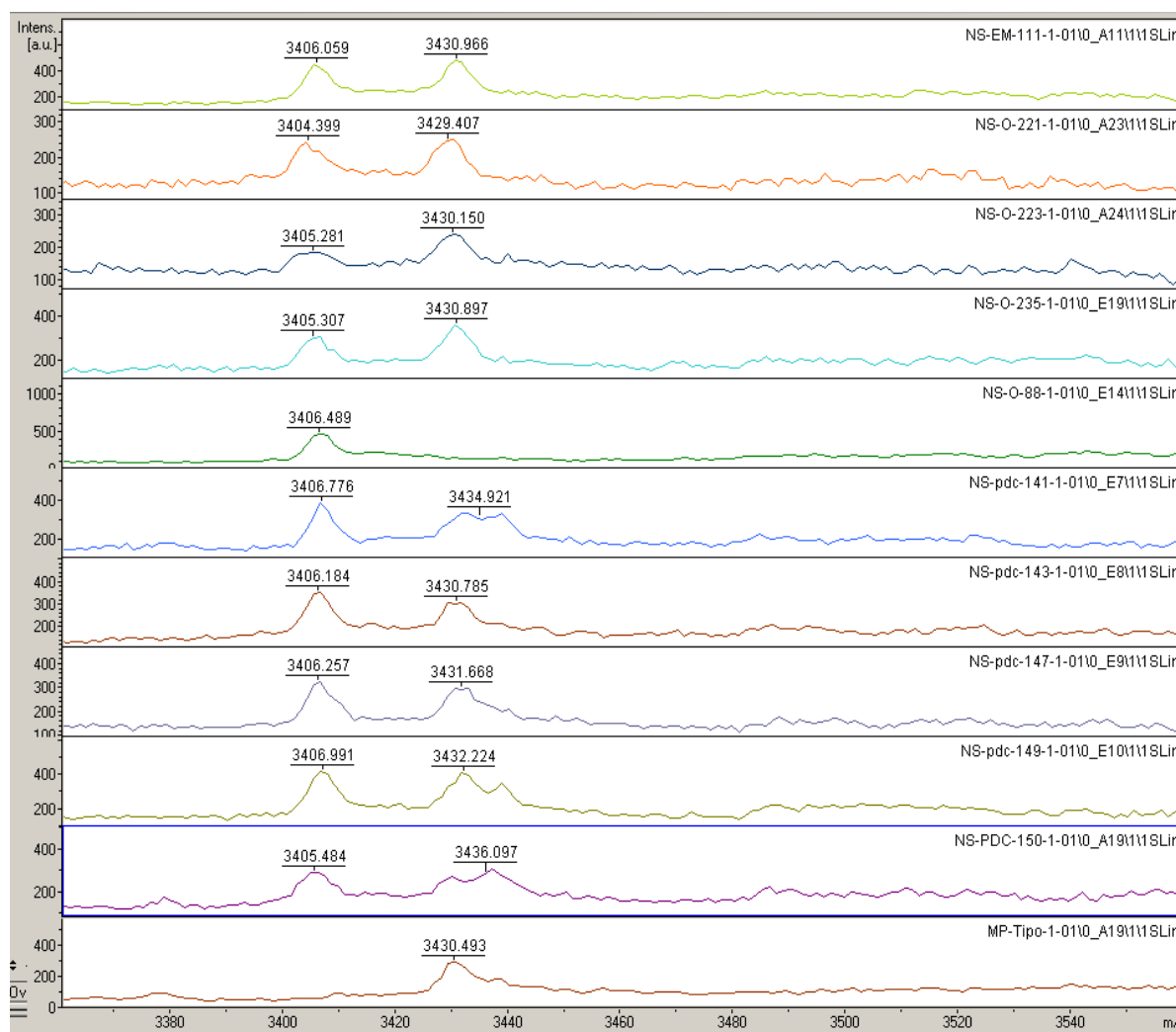


Figura 96. Ampliación de los espectros de masas en la zona relación  $m/z$  3400 - Comparación de *M. pulcherrima* Tipo-CECT11202 con posibles cepas de *M. pulcherrima*

Nuevamente, los resultados parecen confirmar que la identificación previa realizada mediante técnicas clásicas y moleculares es contraria a la realizada por MALDI-TOF MS, ya que las cepas analizadas corresponden a *M. fructicola* y no a *M. pulcherrima*, debido a las diferencias encontradas en torno a las zonas de relación  $m/z$  6800 y 3400 de los espectros de masas.

Por lo que se refiere a la cepa NS-O-88 en las zonas del espectro de masas de relación  $m/z$  6800 y 3800 presenta un solo ión a 3405 y 6815, a diferencia del resto de cepas autóctonas analizadas, por lo que visualmente podría asignarse como *M. fructicola* y no *M. pulcherrima*, así identificada previamente por técnicas clásicas y moleculares. Al identificar esta cepa, utilizando la librería creada, se confirma esta hipótesis, ya que al comparar esta

cepa con el resto de cepas de la librería los mayores porcentajes de similitud, entre el 93 y 85%, coinciden con cepas de la especie *M. fructicola*. Cabe destacar que los máximos porcentajes de similitud corresponden a cepas del género *Metschnikowia*, siendo cepas de especies *M. fructicola* y *M. pulcherrima* las primeras candidatas y a continuación cepas de la especie *M. viticola*; los porcentajes más bajos y nulos de similitud coinciden con cepas de la especie *S. cerevisiae*. En la tabla 108 se presenta el listado con los diez primeros y cinco últimos candidatos.

Tabla 108. Porcentajes de similitud de NS-O-88 con todas las cepas de la librería (22 primeros y 5 últimos candidatos)

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
NS-O-88	100	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	*correcto
NS-O-29	93,65	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-EM-VR-113	86,93	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-207	85	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-150	73,29	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-EM-VR-111	72,23	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-O-235	70,99	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-PDC-143	67,96	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-PDC-149	67,04	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-PDC-141	66,8	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-O-221	66,66	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-PDC-147	65,96	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-O-223	65,7	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NS-PDC-14	64,95	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
NS-PDC-257	64,57	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	
MF- Tipo- CBS8853	64,19	<i>Metschnikowia fructicola</i> Tipo- CBS8853	
NS-O-120	61,47	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
NS-O-45	57,94	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-O-100	56,07	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-O-97	54,7	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-O-32	53,69	<i>Metschnikowia viticola</i>	
NS-O-35	51,06	<i>Metschnikowia viticola</i>	
.....	.....	.....	
S-G-15	0	<i>S. cerevisiae</i>	
S-G-45	0	<i>S. cerevisiae</i>	
S-O-289	0	<i>S. cerevisiae</i>	
S-O-331	0	<i>S. cerevisiae</i>	
S-O-335	0	<i>S. cerevisiae</i>	

Finalmente, al identificar la cepa Tipo de *M. pulcherrima* por comparación con todas las cepas presentes en la librería, se observa que tiene un porcentaje del 100% de similitud consigo misma y la siguiente cepa con mayor coincidencia, se corresponde con una cepa de la especie *M. pulcherrima*, asignándose de forma generalizada los mayores porcentajes de similitud siguientes a cepas del género *Metschnikowia*. En la tabla 109 se visualizan estos datos, presentando un listado con los 22 y 5 últimos candidatos.

Tabla 109. Porcentajes de similitud de *M. pulcherrima* Tipo- CECT11202 con todas las cepas de la librería (22 primeros y 5 últimos candidatos)

Cepa	% similitud	Especie	Observaciones
<b>NS-O-88</b>	100	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	*correcto
<b>NS-O-29</b>	93,65	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
<b>NS-EM-VR-113</b>	86,93	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
<b>NS-PDC-207</b>	85	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
<b>NS-PDC-150</b>	73,29	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-EM-VR-111</b>	72,23	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-O-235</b>	70,99	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-PDC-143</b>	67,96	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-PDC-149</b>	67,04	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-PDC-141</b>	66,8	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-O-221</b>	66,66	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-PDC-147</b>	65,96	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-O-223</b>	65,7	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<b>NS-PDC-14</b>	64,95	<i>Metschnikowia fructicola</i>	
<b>NS-PDC-257</b>	64,57	<i>Cryptococcus amyloletus</i>	
<b>MF- Tipo- CBS8853</b>	64,19	<i>Metschnikowia fructicola</i> Tipo- CBS8853	
<b>NS-O-120</b>	61,47	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<b>NS-O-45</b>	57,94	<i>Metschnikowia viticola</i>	
<b>NS-O-100</b>	56,07	<i>Metschnikowia viticola</i>	
<b>NS-O-97</b>	54,7	<i>Metschnikowia viticola</i>	
<b>NS-O-32</b>	53,69	<i>Metschnikowia viticola</i>	
<b>NS-O-35</b>	51,06	<i>Metschnikowia viticola</i>	
.....	.....	.....	
<b>S-G-15</b>	0	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-G-45</b>	0	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-289</b>	0	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-331</b>	0	<i>S. cerevisiae</i>	
<b>S-O-335</b>	0	<i>S. cerevisiae</i>	

#### 4.2.5. Optimización de variables a considerar en el programa estadístico para crear librería de espectros de masas de cepas de levaduras vínicas

La optimización de variables se comenzó fijando dos variables para detectar las líneas que corresponden a los iones más representativos de cada espectro de masas. Por un lado, es importante fijar una SNR suficiente para detectar un número mínimo de líneas representativas de los iones más abundantes en el espectro de masas y, por otro lado, es importante también fijar un número mínimo de líneas representativas a una SNR dada.

Se eligieron varias cepas al azar tanto de no-*Saccharomyces* como de *Saccharomyces* para estudiar la SNR suficiente para obtener un número representativo de líneas de cada espectro de masas. Se verificó el número de líneas obtenidas para SNR fijas de 5, 10, 20, 50, 100 y 200. Se comprueba que para SNR de 200, el programa apenas detecta ninguna línea representativa; según disminuye la señal ruido fijada el número de líneas aumenta, comenzando a obtener un número de líneas aceptable, aproximadamente, a partir de una SNR de 20. Por debajo de 5 no se considera aceptable considerar ninguna línea del espectro de masas debido a que se podría confundir señales del ruido con iones representativos del espectro de masas.

A continuación, utilizando como base los resultados obtenidos en la optimización de la SNR, se consideró necesario fijar el número de líneas típicas de cada espectro de masas, permaneciendo variable una SNR entre 5 y 20, no permitiendo bajar en ningún caso de 5. De esta forma se procesan todos los espectros de masas correspondientes a las cepas analizadas, obteniendo aproximadamente 20 líneas en el espectro de masas correspondientes a los iones más representativos de cada cepa y unas SNR entre 5 y 20, obteniendo en algunos casos, espectros de masas con una señal ruido de 5 que no llegan a presentar 20 líneas.

Como ejemplo de una cepa de no-*Saccharomyces* (NS-O-14), en las figuras 97, 98, 99, 100, 101 y 102 se muestran los resultados obtenidos para la optimización de la SNR a 5, 10,

20, 50, 100 y 200, respectivamente, mostrando en la parte superior derecha del espectro de masas, el número de líneas detectadas y en la parte superior izquierda la SNR fijada.

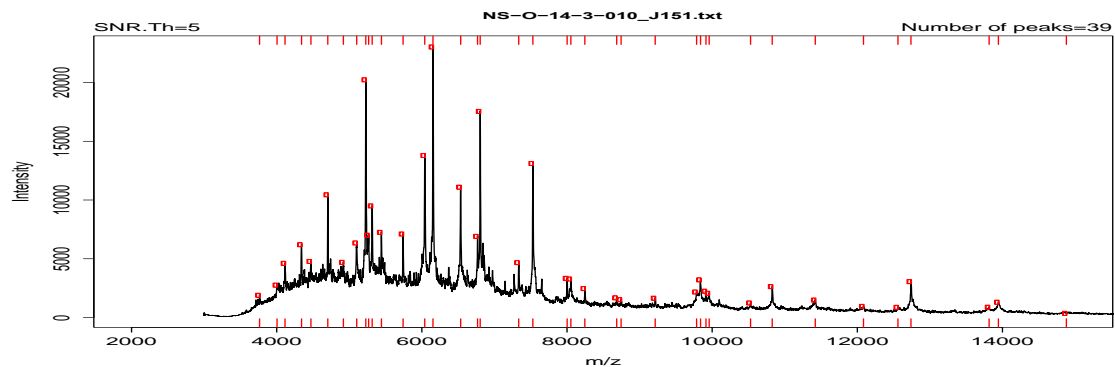


Figura 97. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 5

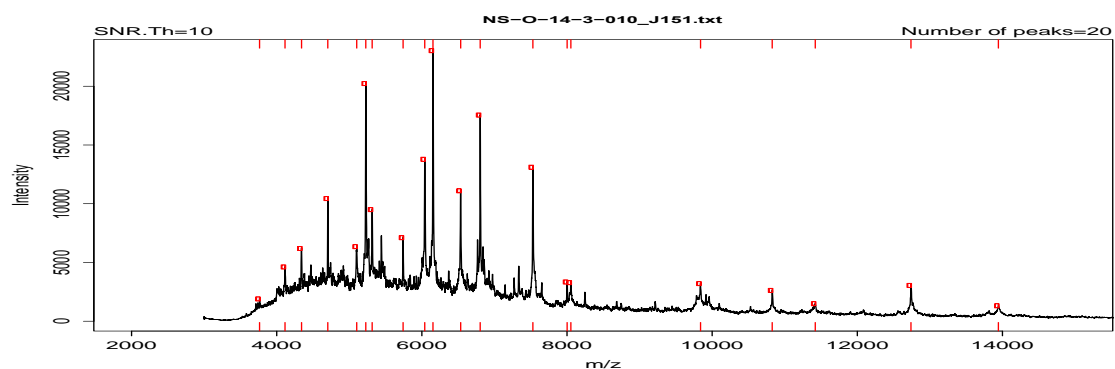


Figura 98. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 10

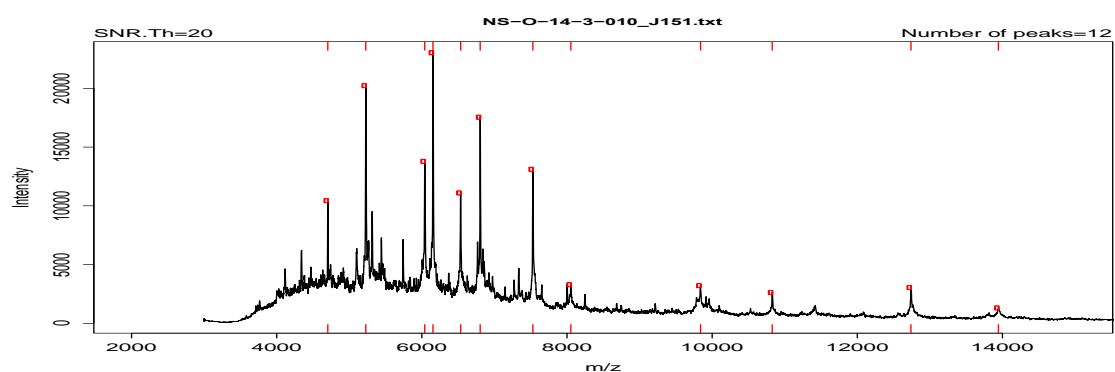


Figura 99. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 20



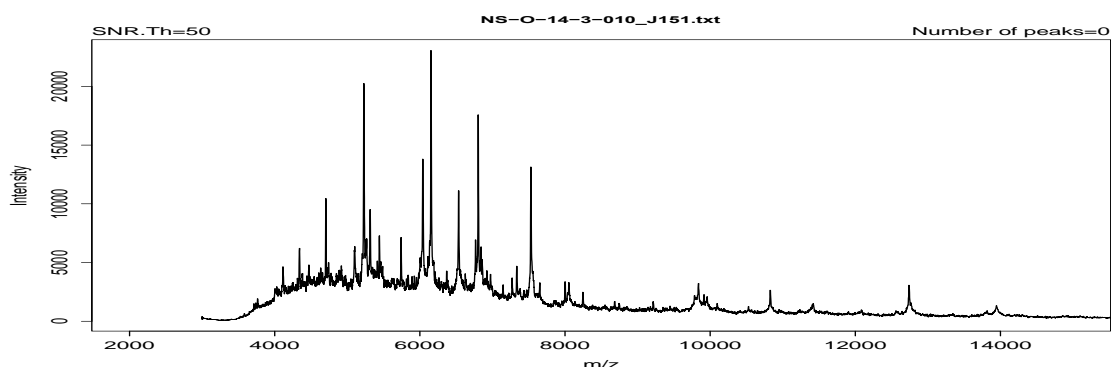


Figura 100. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 50

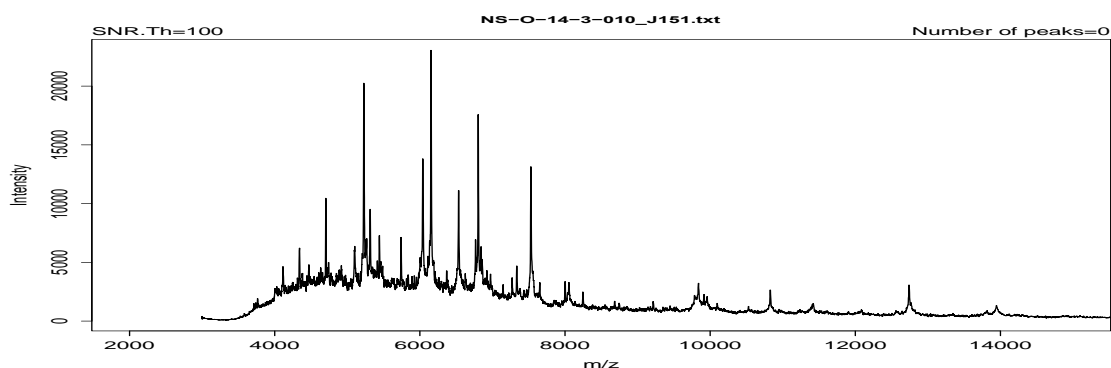


Figura 101. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 100

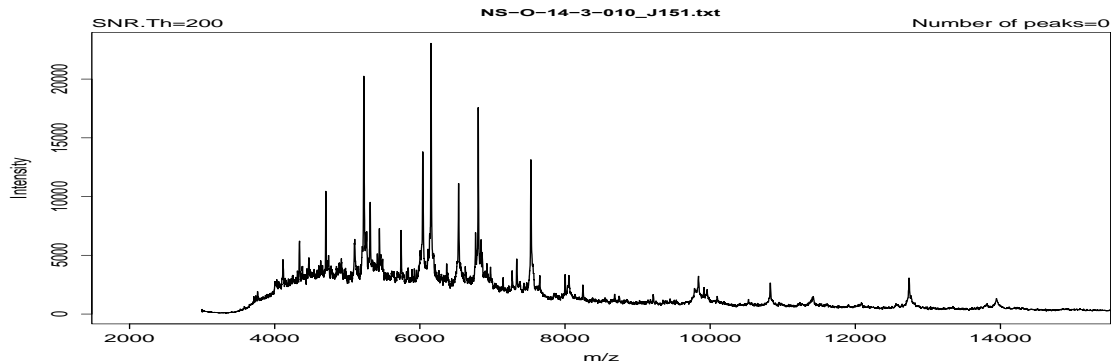


Figura 102. Espectro de masas de la cepa NS-O-14 a una señal/ruido fija de 200

En las figuras 103, 104, 105, 106, 107 y 108 se muestran los resultados obtenidos para la optimización de la SNR a 5, 10, 20, 50 100 y 200, para una cepa no-*Saccharomyces* (NS-PDC-193), mostrando en la parte superior derecha del espectro de masas, el número de líneas detectadas y en la parte superior izquierda la señal/ruido fijada.

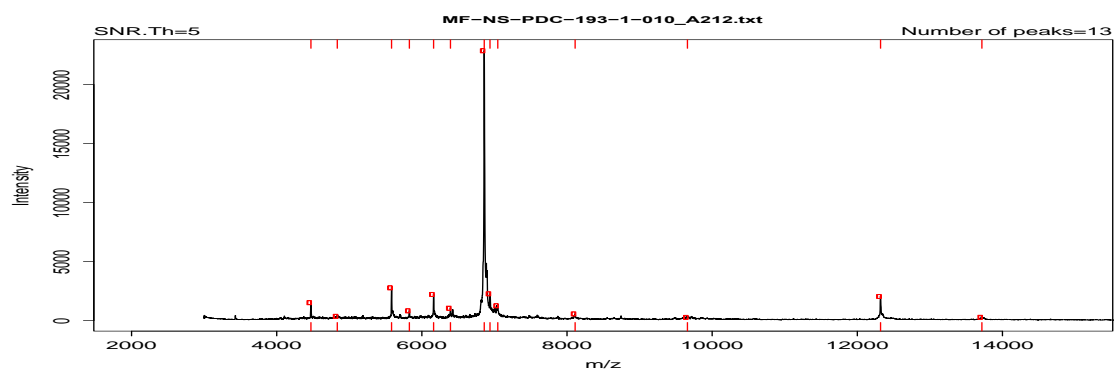


Figura 103. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 5

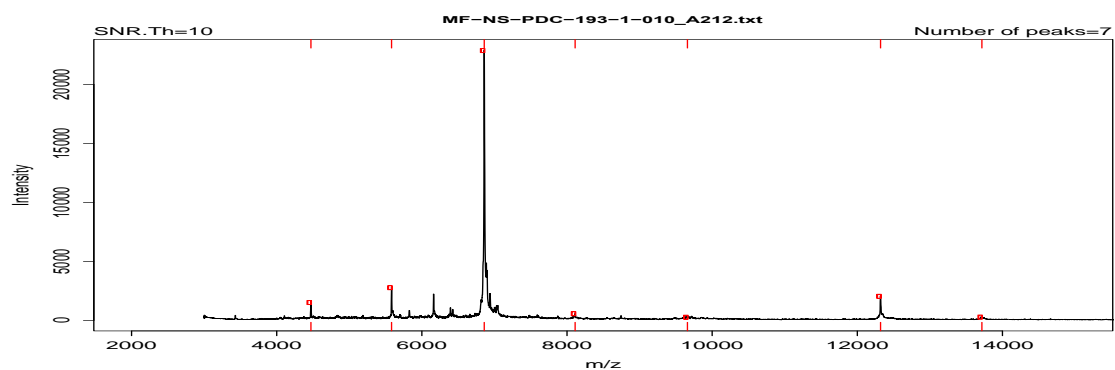


Figura 104. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 10

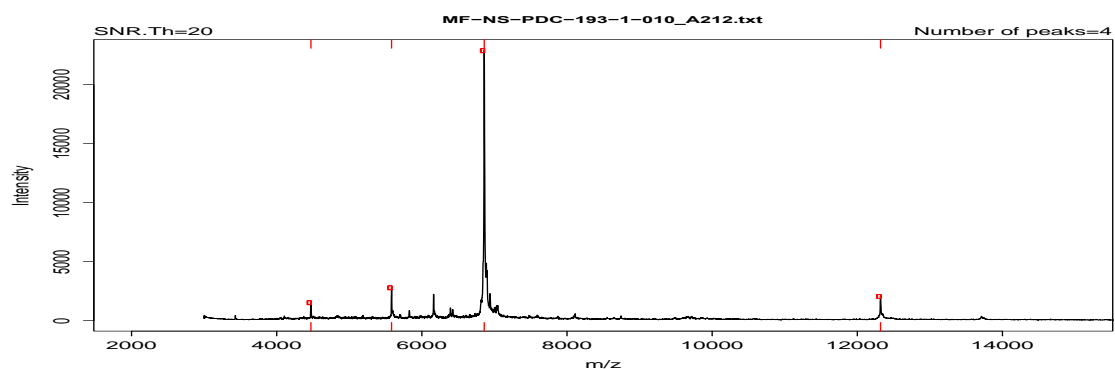


Figura 105. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 20

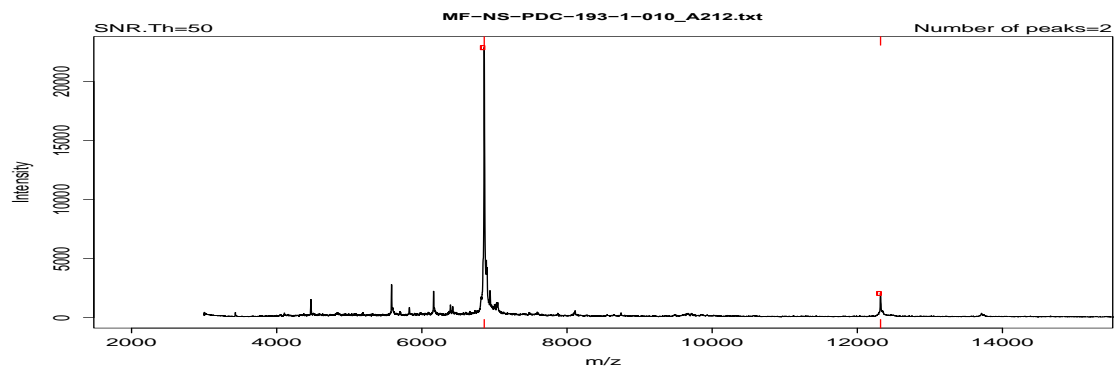


Figura 106. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 50

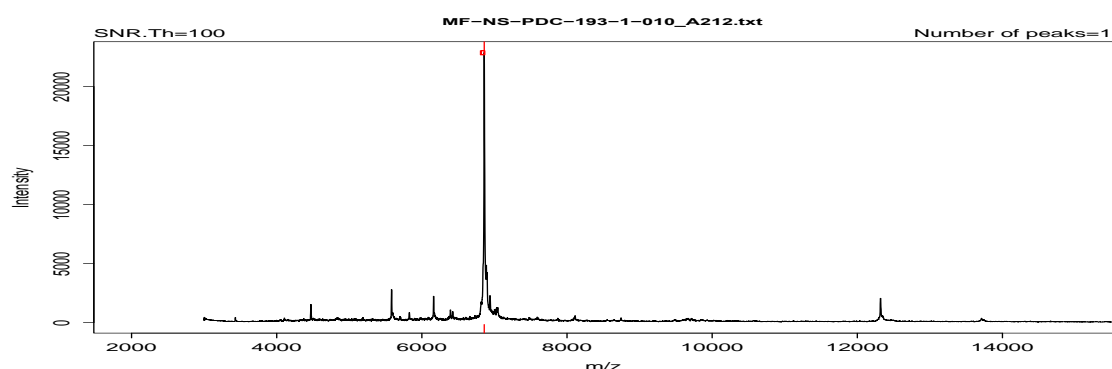


Figura 107. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 100

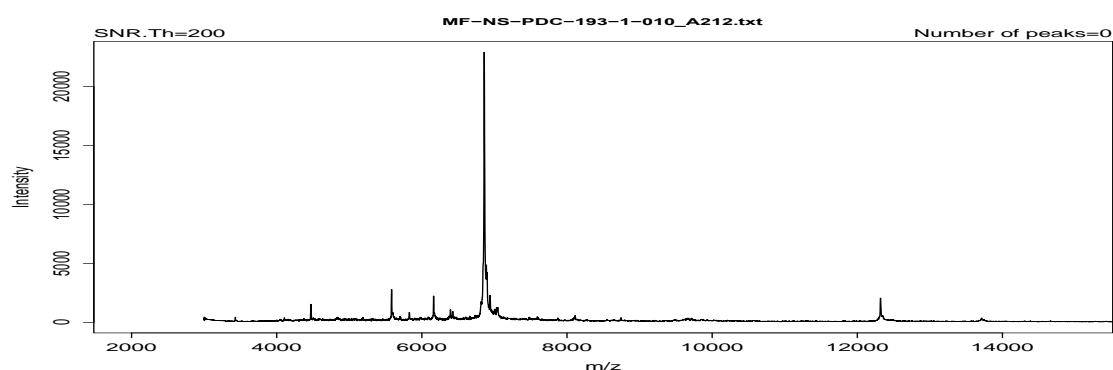


Figura 108. Espectro de masas de la cepa NS-PDC-193 a una señal/ruido fija de 200

En las figuras 109, 110, 111, 112, 113 y 114, se muestran los resultados obtenidos para la optimización de la SNR a 5, 10, 20, 50 100 y 200, para una cepa *Saccharomyces* (S-O-335), mostrando en la parte superior derecha del espectro de masas, el número de líneas detectadas y en la parte superior izquierda la señal/ruido fijada.

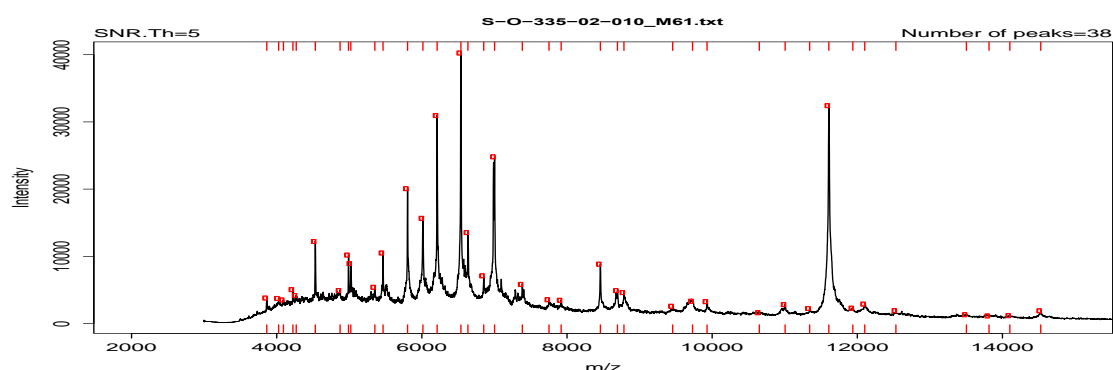


Figura 109. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 5

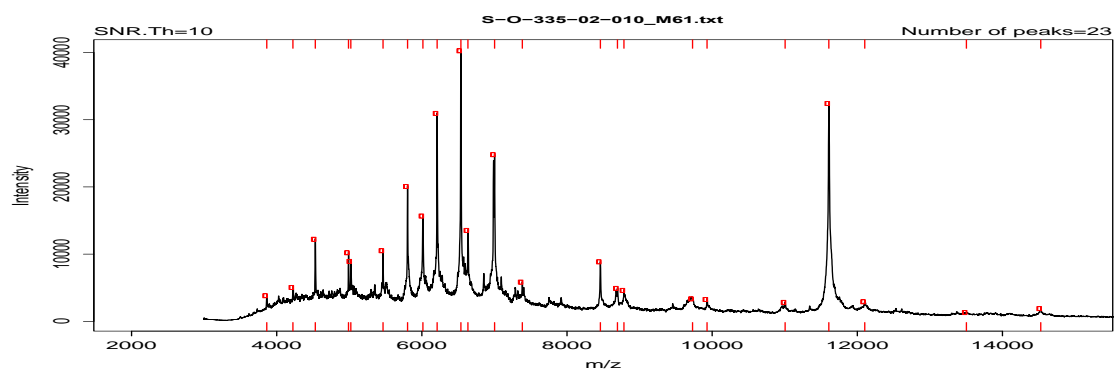


Figura 110. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 10

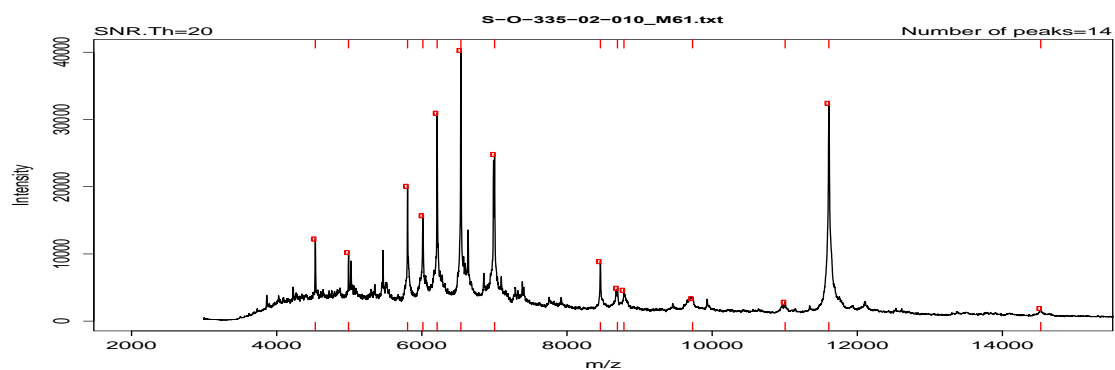


Figura 111. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 20

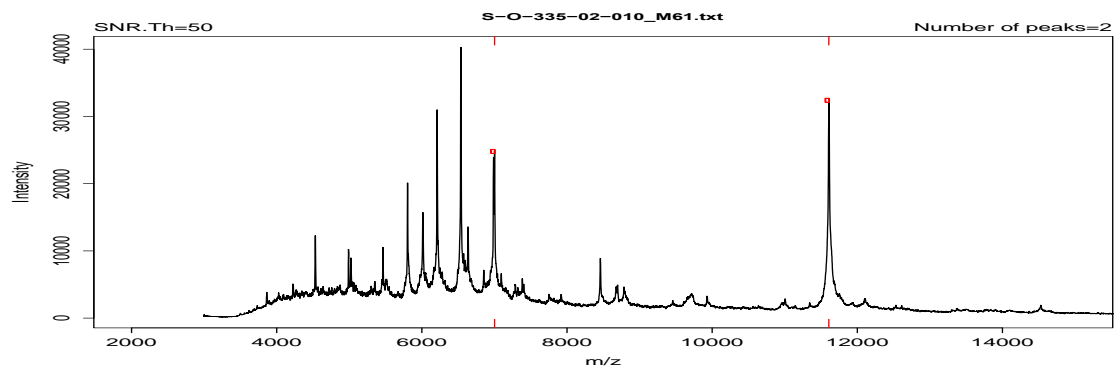


Figura 112. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 50

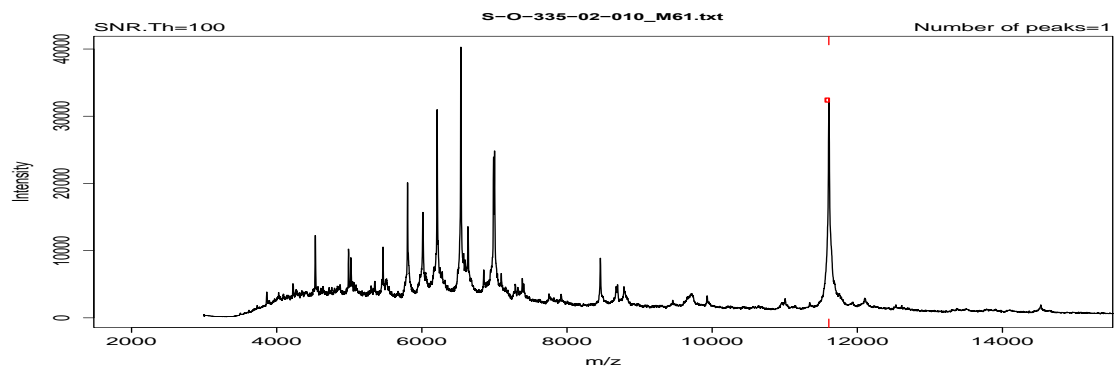


Figura 113. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 100

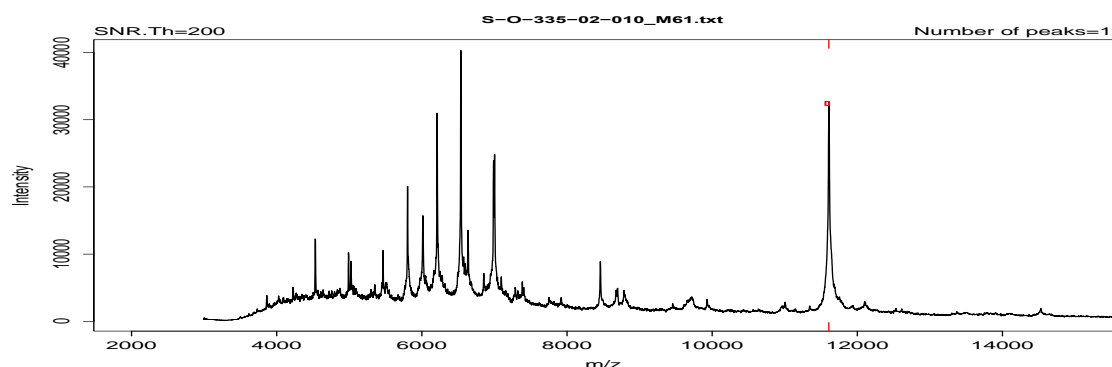


Figura 114. Espectro de masas de la cepa S-O-338 a una señal/ruido fija de 200

En las figuras 115, 116, 117, 118, 119 y 120 se muestran los resultados obtenidos para la optimización de la SNR a 5, 10, 20, 50 100 y 200, para una cepa *Saccharomyces* (S-EM-CV-250), mostrando en la parte superior derecha del espectro de masas, el número de líneas detectadas y en la parte superior izquierda la señal/ruido fijada.

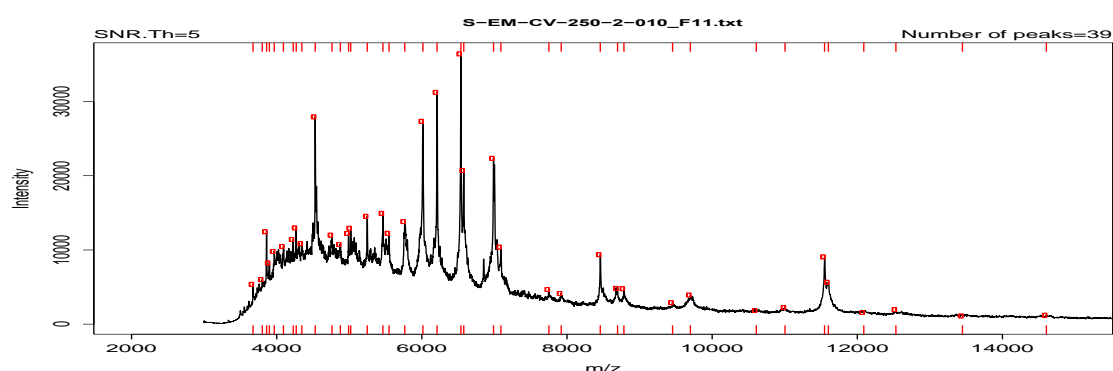


Figura 115. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 5

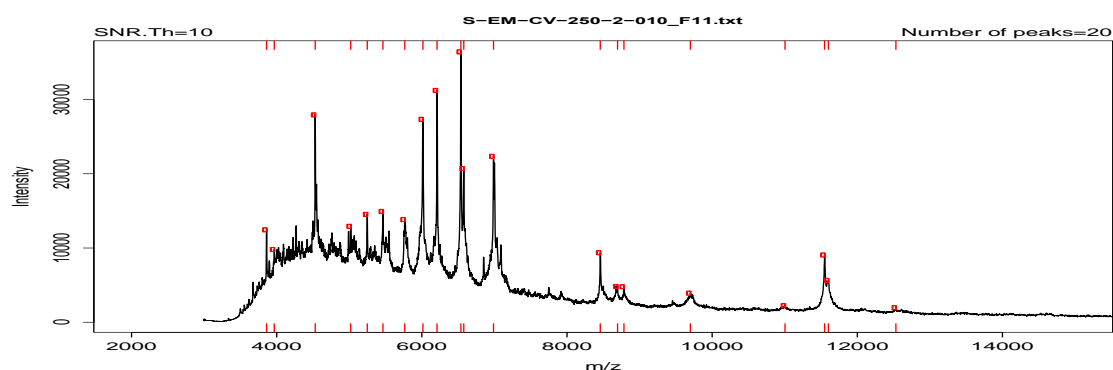


Figura 116. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 10

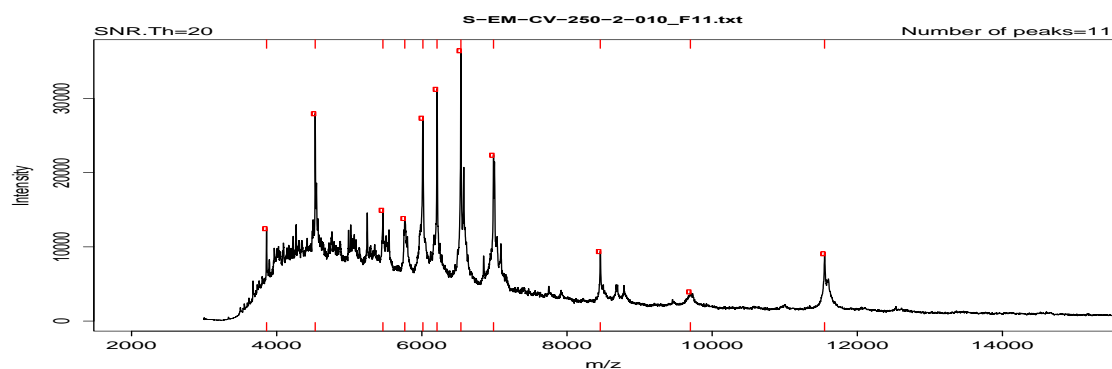


Figura 117. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 20

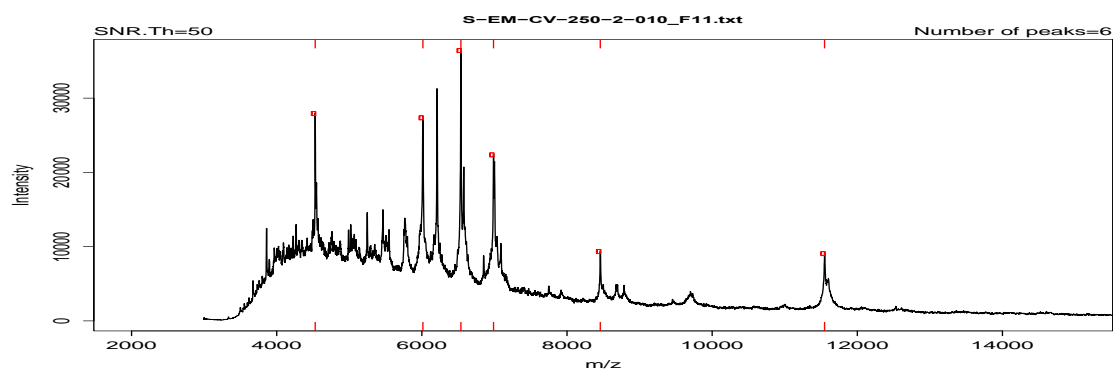


Figura 118. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 50

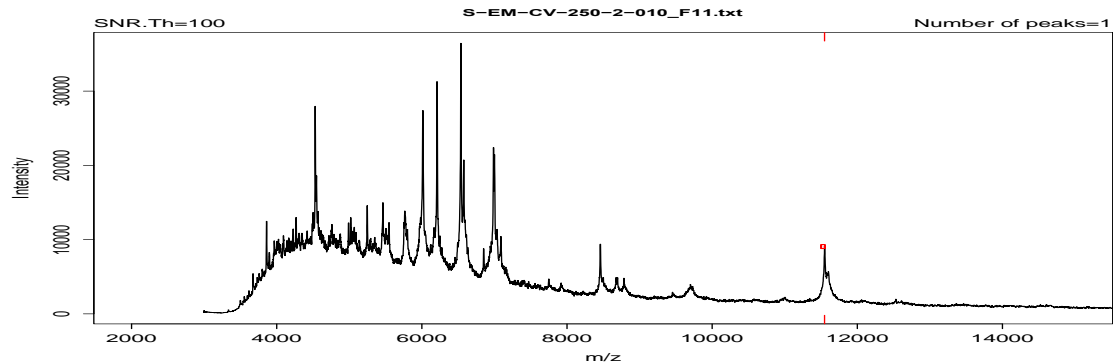


Figura 119. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 100

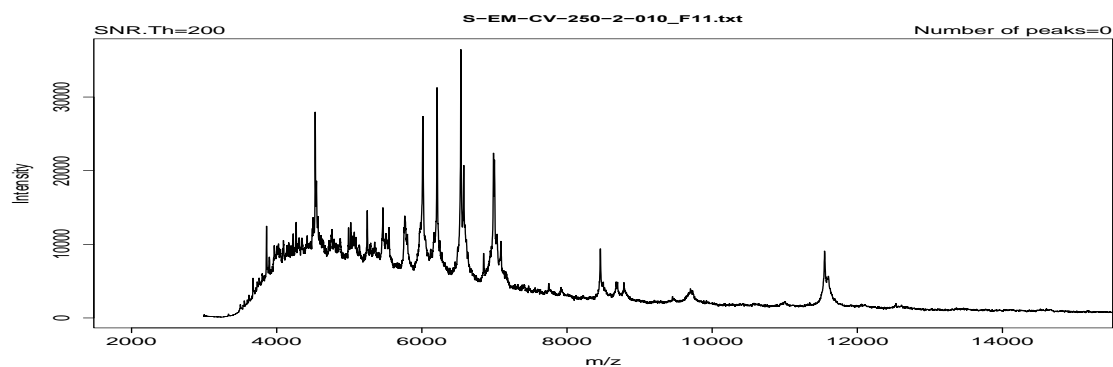


Figura 120. Espectro de masas de la cepa S-O-250 a una señal/ruido fija de 200

En las figuras 121, 122, 123, 124, 125 y 126 se muestran los resultados obtenidos para la optimización de la SNR a 5, 10, 20, 50 100 y 200, para una muestra de calibrante BTS, mostrando en la parte superior derecha del espectro de masas, el número de líneas detectadas y en la parte superior izquierda la señal/ruido fijada.

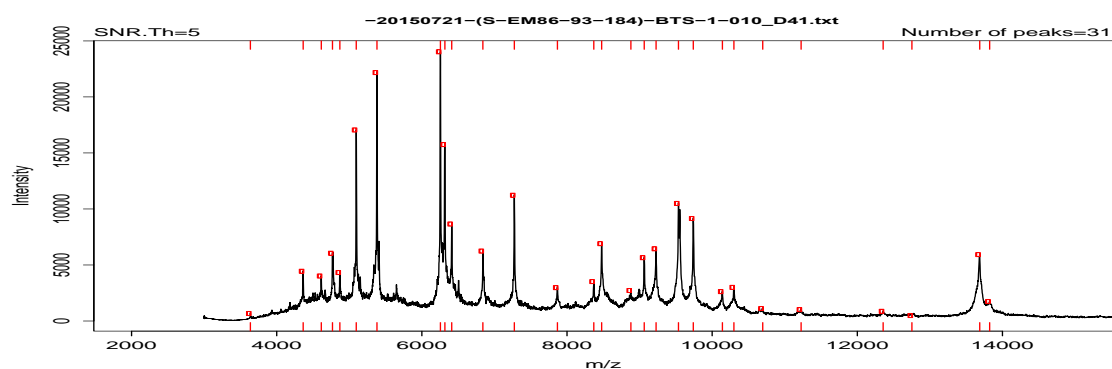


Figura 121. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 5

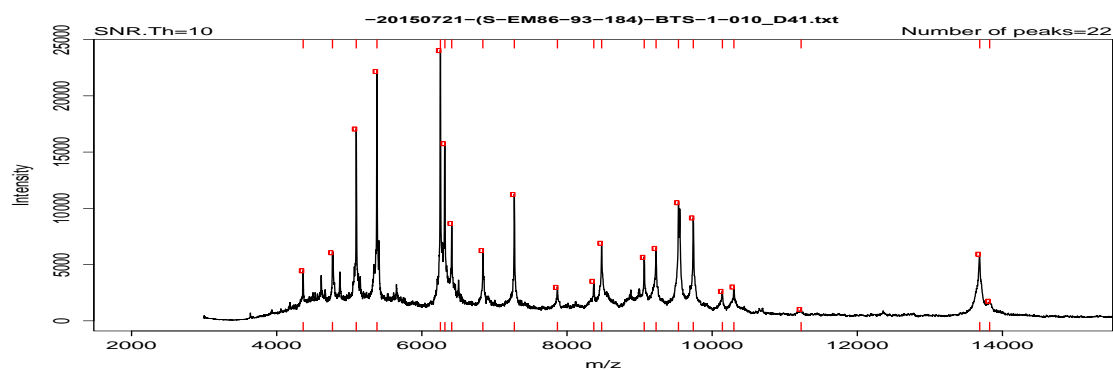


Figura 122. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 10

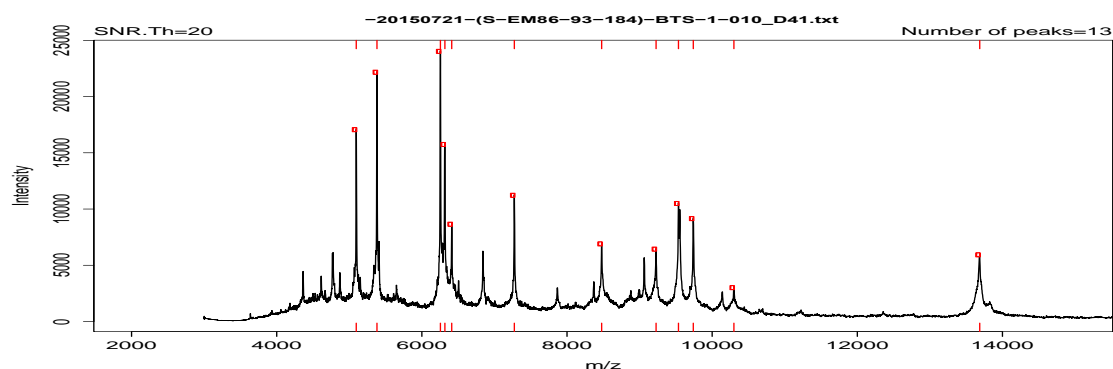


Figura 123. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 20

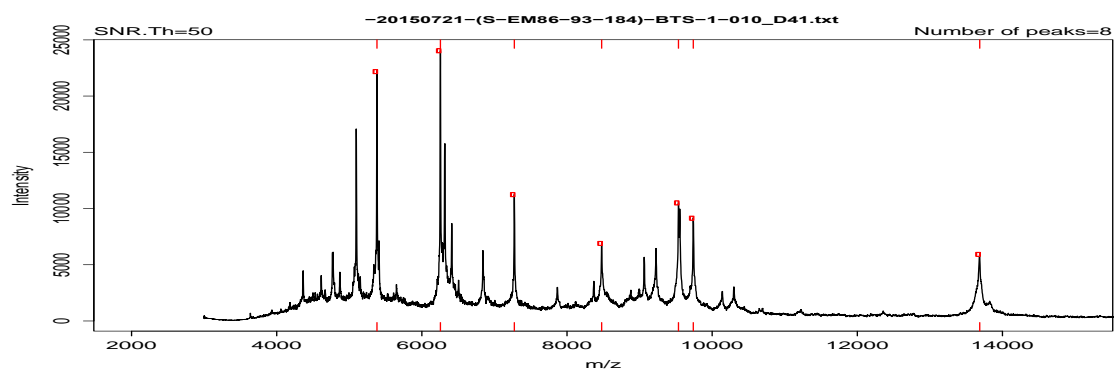


Figura 124. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 50

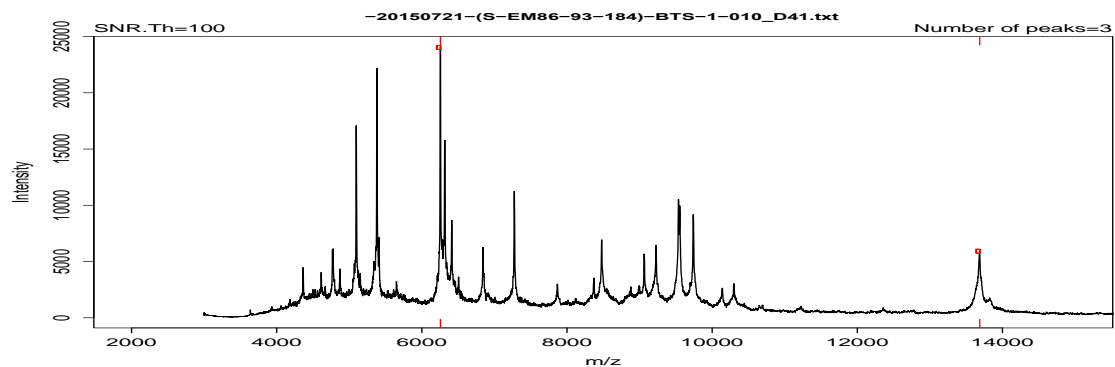


Figura 125. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 100

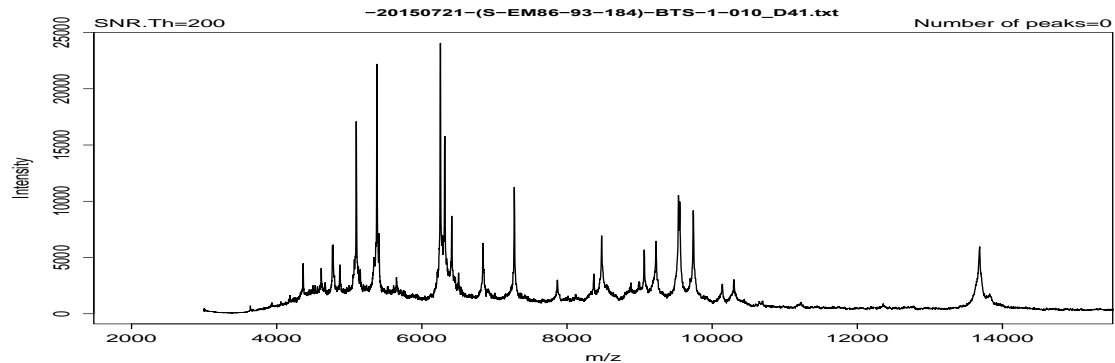


Figura 126. Espectro de masas de una muestra de calibrante BTS a una señal/ruido fija de 200



# Capítulo 5

---

## CONCLUSIONES



## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

La tesis se ha iniciado con el trabajo de aislamiento y selección de levaduras de tipo *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* procedentes de bodegas de tres D.O. distintas. Los análisis mediante técnicas moleculares han servido como base de identificación inicial para el posterior análisis de las cepas mediante MALDI-TOF MS y, finalmente, la creación de una nueva librería de espectros de masas de cepas de levaduras vínicas.

La optimización de los parámetros de preparación de muestra, placa MALDI y disoluciones orgánicas previos al análisis mediante MALDI-TOF MS ha sido necesaria y ha permitido obtener una reproducibilidad suficiente para la creación de una librería de espectros de masas de cepas de levadura del ámbito enológico, previamente identificadas mediante técnicas clásicas y moleculares. Debido a la complejidad y amplitud de los análisis realizados, para la optimización de los métodos descritos en esta Tesis ha sido necesaria la preparación de un pool de muestra de un solo tipo de cepa de levadura, concretamente de una cepa de *S. cerevisiae* en cantidad suficiente para la realización del estudio de las diferentes variables.

Las fuentes de variabilidad que ejercen los efectos más importantes sobre los espectros de masas han sido la cantidad de muestra, tipo de placa MALDI, composición de las disoluciones orgánicas y tipo de matriz, entre otros. Un aspecto importante no considerado en otros estudios hasta el momento ha sido el procedimiento de aplicación de la gota depositada sobre la placa MALDI, comprobándose el efecto crítico de la tensión superficial.

La librería creada contiene 216 espectros de masas sintéticos con fines de clasificación, comparación e identificación de cepas y especies de levadura. Para su elaboración se ha desarrollado un programa estadístico que permite comparar unas cepas con otras, obteniendo porcentajes de similitud entre ellas dependiendo de sus relaciones filogenéticas. Los espectros de masas se han introducido en formato ASCII en dicho programa estadístico que trabaja en lenguaje Fortran, obteniéndose espectros sintéticos de cada cepa y especie

para una comparación óptima. Los criterios para la selección de los iones más representativos de cada espectro de masas han sido, la selección de un número fijo de aproximadamente 20 líneas y una variación de la SNR en un margen entre 5 y 20.

La capacidad de identificación de la librería se ha validado mediante análisis de un número de cepas previamente identificadas mediante técnicas clásicas y moleculares y posteriormente analizadas por MALDI-TOF MS e incluidas en la librería. La librería muestra una gran eficacia para la diferenciación a nivel de especie e incluso cepa en el grupo de cepas de géneros no-*Saccharomyces*. Sin embargo, en la especie *Saccharomyces cerevisiae* solo ha sido posible la diferenciación a nivel especie, ya que la diferenciación a nivel de cepa no ha sido posible para todas las cepas analizadas y diferenciadas entre sí en base a sus polimorfismos genéticos. Sin embargo, cabe resaltar que se pudieron establecer grupos de cepas, con un porcentaje de similitud mayor entre ellas en base a sus espectros de masas, y que presentaban un origen o característica común, como por ejemplo el haber sido aisladas utilizando el medio de lisina en el cual, habitualmente, la especie *S. cerevisiae* no es capaz de crecer.

Como resumen, las dos aportaciones más novedosas de esta tesis, son las siguientes:

- La creación e inclusión de una librería de datos de espectros de masas MALDI-TOF MS correspondientes a especies de levadura del ámbito enológico, que hasta ahora no estaban disponibles en las librerías comerciales de los espectrómetros de masas. Los datos generados son abiertos, a diferencia de los incluidos en los programas y librerías comerciales, lo que permitirá el libre acceso a la comunidad científica y el avance en este campo.
- Avances en la diferenciación taxonómica de levaduras muy cercanas filogenéticamente entre sí. Por ejemplo, la posibilidad de diferenciar mediante análisis MALDI-TOF MS dos especies del género *Metschnikowia*, *M. fructicola* y *M. pulcherrima* cuya distinción mediante técnicas clásicas y moleculares presenta dificultades.

Como investigaciones para un futuro inmediato se menciona la ampliación de la librería y la clasificación y agrupación de cepas del género *Saccharomyces* mediante análisis clúster. Por otra parte, esta tesis abre un área de investigación extensible a microorganismos de interés en otros campos de la microbiología como puede ser el estudio de protistas del medio acuático que sirven como bioindicadores de la calidad de las aguas.

El interés práctico de la tesis para los enólogos en las bodegas radica en la posibilidad de identificar mediante una técnica rápida y precisa las cepas de levaduras seleccionadas para mejorar y controlar el proceso de fermentación para la obtención del vino, así como la detección de levaduras no deseadas que se encuentran presentes durante las primeras etapas de la fermentación y que son responsables habitualmente de la producción de defectos organolépticos en el vino.



# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---





## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agustini, B. S. (2014). Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. *Applied microbial and cell physiology*, 98, 5645–5654.

Álvarez Pérez, J. M. (2011). *Aislamiento y caracterización genética y enológica de levaduras vínicas autóctonas de uva Prieto Picudo y caracterización aromática de sus vinos (DO <<Tierra de León>>)*. León.

Álvarez Pérez, J. M. (2012). Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*, 133, 284-292.

Amiri-Eliasi, B. (2001). Characterization of Protein Biomarkers Desorbed by MALDI from Whole Fungal Cells. 73, 5228-5231.

Anhalt, J. P. (1975). Identification of Bacteria Using Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 47(2).

Ayala Bretón Camilo de Regil Hernández, R. (2004). *Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas*.

Bader, O. W. G. (2011). Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9), 1359-1365.

Bader, O. W.G. (2011). Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1359-1365.

Barnett, J. (1992). The taxonomy of the Genus *Saccharomyces* Meyen ex Rees: a Short Review for Non-taxonomist. *Yeast*, 8, 1-23.

Belda Aguilar, I. (2013). *Aislamiento y caracterización de levaduras autóctonas con óptimas propiedades enológicas procedentes de uvas de la variedad prieto picudo*. Madrid.

Belda Manzanos, P. J. (2014). *Identificación y caracterización completa (ampelográfica, genética, agronomica, enológica, polifenólica, aminoacídica, aromática y sensorial*. La Rioja.

Belloch, C. Q. (2000). Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 405–416.

Blättel, V. P. (2013). Differentiation of species of the genus *Saccharomyces* using biomolecular fingerprinting methods. *Methods and protocols*, 97, 4597–4606.

Boekhout, T. K. (1996). Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, 1-81.

Bohme, K. F.-N.-V.-M. (2010). Comparative analysis of protein extraction methods for the identification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Methods*, 2, 1941–1947.

Bonner, T. B. (1973). Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. *Journal of Molecular Biology*, 81, 123–135.

Bougnouxa, M. A. (2013). Identification des levures par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. *Revue francophone des laboratoires*(450), 63-69.

Britten, R. G. (1974). Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Methods in enzymology*, 29, 363– 418.

Bruker. (2012). *Bruker Guide to MALDI Sample Preparation*. Obtenido de [www.care-bdal.com](http://www.care-bdal.com).

Bruker. (2012). [www.care-bdal.com](http://www.care-bdal.com).

Cai, J. R. (1996). Phylogenetic Relationships among Members of the *Ascomycetous* Yeast Genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* Deduced by Small-Subunit rRNA Gene Sequences. *International journal of systematic bacteriology*, 46(2), 542-549.

Carrau, F. (2005). Levaduras nativas para enología de mínima intervención. Biodiversidad, selección y caracterización. *Agrociencia*, 9(1-2), 387 - 399.

Cendejas-Bueno, E. G.-L.-T.-E. (2010). *Journal Clinical Microbiology. Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods*(48), 1895–1899.

Chalupová, J. R. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*, 32, 230–241.

Chao, Q. L. (2014). Comparison of the Accuracy of Two Conventional Phenotypic Methods and Two MALDI-TOF MS Systems with That of DNA Sequencing Analysis for Correctly Identifying Clinically Encountered Yeasts. *Plos one*, 9(10).

Chen, Y. L. (2015). Evaluation of the matrix-assisted laser desorption/ionizationtime-of-flight mass spectrometry Bruker Biotyper for identification of *Penicillium marneffe*, *Paecilomyces species*, *Fusarium solani*, *Rhizopus species*, and *Pseudallescheria boydii*. *Frontiers in Microbiology*, 6(679).

Ciani M., C. F. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a newperspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts inwinemaking. *FEMS Yeast Res*, 10, 123–133.

Clark, C. K. (2013). Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *Journal of Microbiological Methods*, 94, 180–191.

Cletus, P. K. (2005). Yeast Systematics and Phylogeny – Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. *The yeast handbook*.

Cocolin, L. P. (2004). Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research*, 5, 37-245.

Combinaa, M. E. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*(99 ), 237– 243.

Contreras A., H. C. (2014). Evaluation of Non-*Saccharomyces* Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1670–1678.

De Barros Lopes, M. R. (1999). AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 915–924.

De Carolis, E. A. (2014). Development and Validation of an In-House Database for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Yeast Identification Using a Fast Protein Extraction Procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1453–1458.

Demirev, P. F. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *John Wiley & Sons, Inc*, 20, 157-171.

Domizio, P. ,. (2014). Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiology*, 43, 5-15.

Egli, M. a. (2000). Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphisms in the rRNA internal transcribed spacer region. *Food Technol Biotechnol*, 38, 69-75.

Escalante-Minakata, P. I.-J. (2007). Los Cultivos Mixtos y las Fermentaciones Alcohólicas. *BioTecnología*, 11(3), 28-36.

Esteve-Zarzoso, M. P. (1998). The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. *Internaternational microbiology*, 1, 143–148.

Everley, R. M. (2008). Liquid chromatography/mass spectrometry characterization of *Escherichia coli* and *Shigella* species. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*(19), 1621-1628.

Fell, J. B. (1999). Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA, IGS and ITS sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 677–681.

Fell, J. B. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50, 1351–1371.

Fernández Olmos, A. G. (2010). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. (E. C. Cantón, Ed.) *Procedimientos en Microbiología Clínica*.

Fernández, I. C. (2012). *Desarrollo de nuevos métodos moleculares de control de microrganismos alterantes y patógenos en alimentos de origen marino*. Santiago de Compostela.

Fernández-Espinar, M. B. (2003). Analisis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*, 20, 1213-1226.

Gadanhó, M. A. (2003). Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84, 217–227.

Geiser, D. P. (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(1), 388–393.

Godoy, A. (2013). *Aislamiento e identificación molecular de especies de levaduras No-Saccharomyces presentes en uvas*. Montevideo.

Goncalves de Freitas, L. (2012). *Comparación de 4 métodos de procesamiento de frascos de hemocultivo para su análisis por MALDI-TOF*. Valladolid.

Goodacre, R. H. (1999). Characterisation of intact microorganisms using electrospray ionisation mass spectrometry. *FEMS Microbiology Letters*, 176, 17-24.

Graifer, D. K. (2014). Roles of ribosomal proteins in the functioning of translational machinery of eukaryotes. *Biochimie*, 109, 1-17.

Guillamón, J. S. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387–392.

Guzmán, B. L. (2013). Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect–yeast association: Have yeast and angiosperm lineages co-diversified? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, 161-175.

Heide-M., D. S. (2001). Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1593–1606.

Himmelreich, U. S. (2005). A rapid screening test to distinguish between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using NMR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 327–332.

Himmelreich, U. S. (2003). Rapid Identification of *Candida* Species by Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and a Statistical Classification Strategy. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4566–4574.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. (2015). Obtenido de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.chromacademy.com>. (2015). Obtenido de <http://www.chromacademy.com/>

<http://www.larevistainformatica.com/FORTRAN.htm>. (2006). Obtenido de <http://www.larevistainformatica.com/FORTRAN.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. (s.f.). Obtenido de [\(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Hu, Q. N. (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry*, 40, 430–443.

Hui, L. Y. (2015). Potential extra-ribosomal functions of ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research*, 177, 28-33.

Ibelings, M. M. (2004). Rapid identification of *Candida* spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy. *Clin Microbiol Infect*, 11, 353–358.

Intelicato-Young, J. F. (2013). Mass spectrometry and tandem mass spectrometry characterization of protein patterns, protein markers and whole proteomes for pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 92, 381–386 .

Jamal, W. A. (2014). Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. *International Journal of Infectious Diseases*, 26, 167–170.

Jamal, W. Y. (2013). Rapid identification of pathogens directly from blood culture bottles by Bruker matrix-assisted laser desorption laser ionization-time of flight mass spectrometry versus routine methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 404-408.

James, S. C. (1996). Use of an rRNA internal transcribed spacer región to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. *International journal of systematic bacteriology.*, 46(1), 189–194.

Jolly, N. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. S Afr J Enol Vitic. *South African Journal for enology and viticulture*, 27(1). Obtenido de [http://www.researchgate.net/publication/228634007\\_The\\_role\\_and\\_use\\_of\\_non-Saccharomyces\\_yeasts\\_in\\_wine\\_production.\\_S\\_Afr\\_J\\_Enol\\_Vitic](http://www.researchgate.net/publication/228634007_The_role_and_use_of_non-Saccharomyces_yeasts_in_wine_production._S_Afr_J_Enol_Vitic)

Jolly, N. (2003). The Occurrence of Non-*Saccharomyces cerevisiae* Yeast Species Over Three Vintages in Four Vineyards and Grape Musts From Four Production Regions of the Western Cape, South African. *Journal for Enology and Viticulture*, 2, 1-10.

Jolly, N. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res*, 14, 215–237.

Jordana-Lluch, E. M. (2012). La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(10), 635–644.



Karlsson, R. G. (2015). Proteotyping: Proteomic characterization, classification and identification of microorganisms – A prospectus. *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 246-257.

Kreger-Van Rij, N. (1984). The yeast, a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier.

Kurtzman, C. (1993). DNA-DNA hybridization approaches to species identification in small genome organisms. *Methods in enzymology*, 224, 335–348.

Kurtzman, C. (1998). The yeasts, a taxonomic study.

Kurtzman, C. (2011). The Yeasts, 5th Edition.

Kurtzman, C. (1994). Synonymy of the yeast genera *Wingea* and *Debaryomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(4), 337-342.

Kurtzman, C. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331–371.

Kurtzman, C. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res*, 3, 417–432.

Kurtzman, C. (1991). Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast*, 7, 61-72.

Kurtzman, C. (2001). *Metschnikowia fructicola*, a New Ascosporic Yeast with Potential for Biocontrol of Postharvest Fruit Rots. *Systematic and Applied Microbiology*(24), 395–399.

La Scola, B. R. (2009). Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE*, 4(11), 1-6.

Lee, M. C.-S.-W. (2015). Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems, Vitek MS and Microflex LT, for the identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laborat. *Journal of Microbiological Methods*, 113, 13-15.

Legras, J. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 249-255.

Lindsay, G. S. (2010). Rapid Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 48(2), 444–447.

Lodder, J. (1970). *The yeasts, a taxonomic study*.

Lodder, J. (1952). *The yeasts, a taxonomic study*.

Lopez Mestanza, I. (2013). Aplicación de la técnica MALDI-TOF en la identificación de micobacterias atípicas. Valladolid.

Mahmoud Hamasha, K. (2011). *Raman spectroscopy for the microbiological characterization and identification of medically relevant bacteria*. Detroit.

March Rosselló, G. A. (2012). *Aplicación de la técnica MALDI-TOF en la identificación microbiana a partir de muestra directa de orina y de frasco de hemocultivo crecido*. Valladolid.

Marinach Patrice, C. L.-Y. (2009). Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clinical Microbiology Infection*, 15, 634–642.

Marklein, G. J. (2009). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *Journal of clinical microbiology*, 47(9), 2912–2917.

Martini, A. (1993). Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Wine Res*, 165-176.

Maynard, D. M. (2004). Characterizing complex peptide mixtures using a multi-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry system: *Saccharomyces cerevisiae* as a model system. *Journal of Chromatography B*, 810, 69–76.

Meuzelaar, H. K. (1973). Technique for fast and reproducible fingerprinting of bacteria by pyrolysis mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 45(3), 587–590.

Moothoo-Padayachie, A. R. (2013). Biotyping *Saccharomyces cerevisiae* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Food Research and Technology*, 236, 351–364.

Moussaoui, W. B. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(11), 1631-1638.

Nenoff, P. E. (2013). MALDI-TOF mass spectrometry – a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Medical Mycology*, 51, 17-24.

Ness, F. L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 89-94.

Nieto Galarza, H. O. (2009). *Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando Saccharomyces cerevisiae y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol*. Sangolqui.

Nomura, F. (2015). Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochimica et Biophysica Acta*(1854), 528–537.

Nordhoff, E. S. (2003). Sample preparation protocols for MALDI-MS of peptides and oligonucleotides using prestructured sample supports. *International Journal of Mass Spectrometry*, 226, 163–180.

O'Donnell, K. K. (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. 97(14), 7905–7910.

Pan D., W. A. (2006). Improved peak detection in mass spectrum by incorporating continuous wavelet transform-based pattern matching. *Bioinformatics*, 22(17), 2059-2065.

Panda, A. G. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *Journal of Microbiological Methods*, 109, 93-105.

Pavlovic, M. (2013). Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *The Open Microbiology Journal*, 7, 135-141.

Peterson, S. K. (1991). Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 14, 124-129.

Pierce, C. (2011). *High throughput mass spectrometry for microbial identification*.

Pinto, A. H. (2011). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Identification of Yeasts Is Contingent on Robust Reference Spectra. *Yeast Identification by MALDI-TOF MS*, 6(10), 1-7.

Planta, R. M. (1998). The list of Cytoplasmic Ribosomal Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Funtional Analysis Reports*, 14, 471-477.

Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the Ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.

Price, C. F. (1978). Genome comparison in yeast systematics: Delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiology Reviews*, 42, 161–193.

Regodón Mateos, J. (1997). *Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad*. Recuperado el Septiembre de 2015. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=212>

Relloso, M. N. (2015). Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Revista argentina de microbiologia*, 47(2), 103-107.

Rosenvinge, F. D.-H. (2012). Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates. *mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*, 56, 229–235.

Rosselló, G. M. (2014). *Nuevos protocolos basados en espectrometría de masas y citometria de flujo para un diagnostico microbiológico*. Universidad de Valladolid, Departamento de anatomía patológica, microbiología, medicina preventiva y salud pública y medicina general y forense.

Sanger F, N. S. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*(74), 5463–5467.

Santos, C. P. (2010). Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology*, 108, 375–385 .

Schubert, S. K. (2011). Novel, Improved Sample Preparation for Rapid, Direct Identification from Positive Blood Cultures Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 13(6), 701-706.

Scorzetti, G. F.-T. (2002). Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, 2, 495–517.

Seng, P. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.*, 49, 543–551.

Seng, P. (2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.*, 5(11), 1733–1754.

Shevchenko, A. J. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Biochemistry*, 93, 14440–14445.

Shulman, G. S. (1969). Organic Analysis by Pyrolysis is-Gas Chromatography-Mass Spectrometry A Candidate Experiment for the Biological Exploration of Mars. *Journal of chromatographic science*(7), 36-42.

Simmonds, P. (1970). Whole Microorganisms Studied by Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Detection Experiments. *Applied microbiology*, 20(4), 567-572.

Sipiczki, M. P. (2013). *Metschnikowia* Species Share a Pool of Diverse rRNA Genes Differing in Regions That Determine Hairpin-Loop Structures and Evolve by Reticulation. *Diversity and Reticulate Evolution of Yeast rRNA*, 8(6), 1-13.

Spirek, M. Y. (2003). *Saccharomyces* sensu lato chromosomes are highly dynamic. *FEMS Yeast Res*, 3, 363–373.

Suarez, S. N. (2015). Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. *Pathologie Biologie*, 63, 43-52.

Theel, E. S. (2012). Formic Acid-Based Direct, On-Plate Testing of Yeast and *Corynebacterium* Species by Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 3093–3095.

Usbeck, J. C. (2013). Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDIeTOF MS) in response to varying growth conditions. *Food Microbiology*, 36, 379-387.

Vallejo, J. M. (2013). Atypical yeasts identified as *Saccharomyces cerevisiae* by MALDI-TOF MS and gene sequencing are the main responsible of fermentation of chicha, a traditional beverage from Peru. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 560-564.

Van Baar, B. L. (2000). Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol.Rev.*, 24, 193–219.

Van Herendael, B. (2012). Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*(31), 841–848.

Van Veen, S. Q. (2010). High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of clinical microbiology*, 48(3), 900-907.

Velazquez, E. (2001). YeastIdent-Food/ProleFood, a new system for the identification of food yeasts based on physiological and biochemical tests. *Food Microbiology*(18), 637-646.

Viana, T. (2012). Peculiar H<sup>+</sup> Homeostasis of *Saccharomyces cerevisiae* during the Late Stages of Wine Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6302–6308.

Viramontes Álvarez, R. (2014). *Levaduras vínicas*. Obtenido de [http://www.acenologia.com/correspondencia/levaduras\\_vinicas\\_cor0214.htm](http://www.acenologia.com/correspondencia/levaduras_vinicas_cor0214.htm).

Vogel, J. (2014). Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. *Genomics, Transcriptomics, Proteomics*, 3737–3752.

Wang, C. (2013). Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. *Food Microbiology*(33), 172-177.

Welker, M. M. (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 2-11.

Wenning, M. (2014). Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 44–52.

Westblade, L. (2015). Assessment of Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Bacterial and Yeast Identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(7), 2349-2352.



[www.cerespain.com](http://www.cerespain.com). (2001-2015). Obtenido de <http://www.cerespain.com/tierra-de-leon.html>

[www.cerespain.com](http://www.cerespain.com). (2001-2015). Obtenido de <http://www.cerespain.com/ribera-del-duero.html>

Zuzuarregui Miro, A. (2005). *Caracterización fisiológica y molecular de cepas vínicas de Saccharomyces sp. influencia en su comportamiento durante la vinificación*. Valencia.



# Anexo I

---

Espectros de masas de cepas  
vínicas de la especie *S. cerevisiae*



## ANEXO I: Espectros de masas de cepas vínicas de la especie *S. cerevisiae*

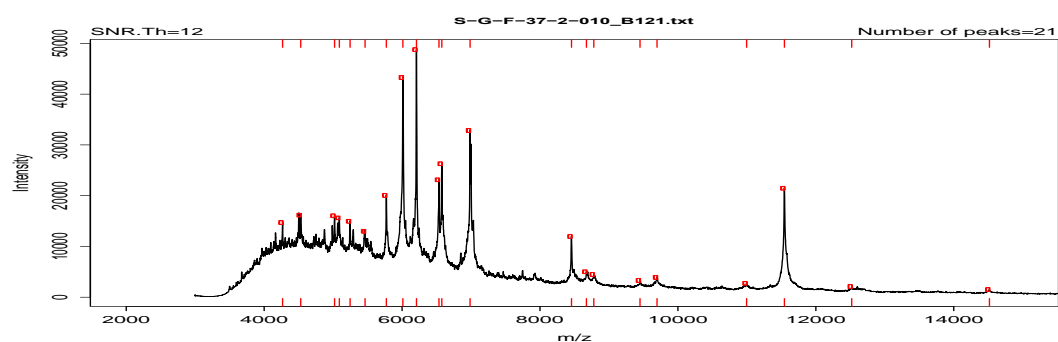


Figura 127. S-G-37. *S. cerevisiae*

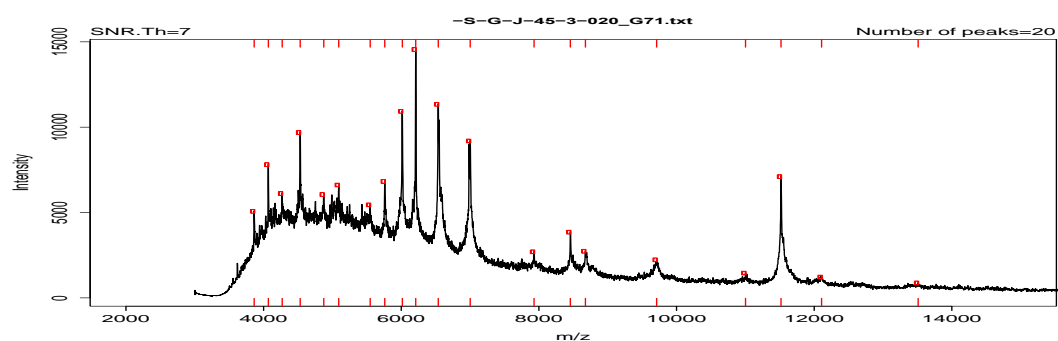


Figura 128. S-G-45. *S. cerevisiae*

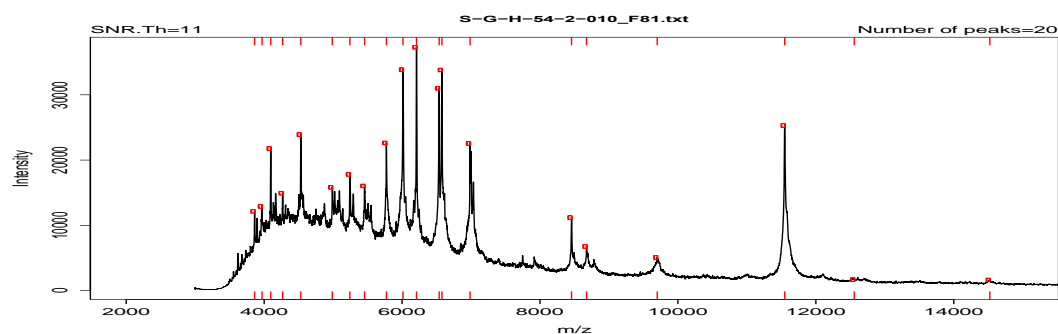


Figura 129. S-G-54 *S. cerevisiae*

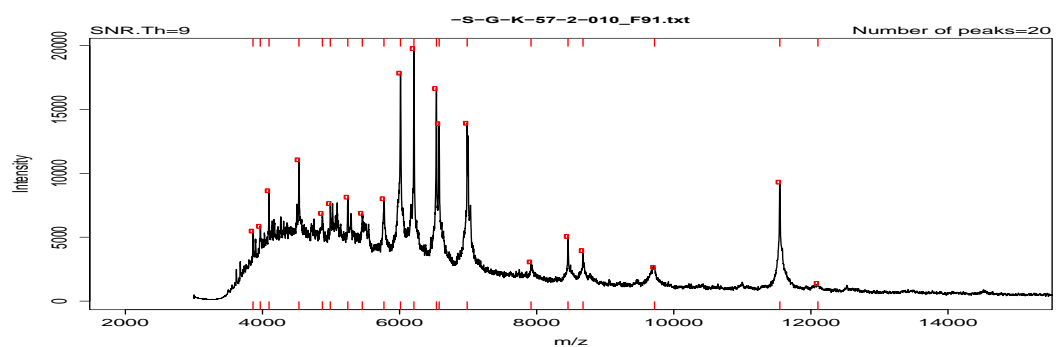


Figura 130. S-G-57. *S. cerevisiae*

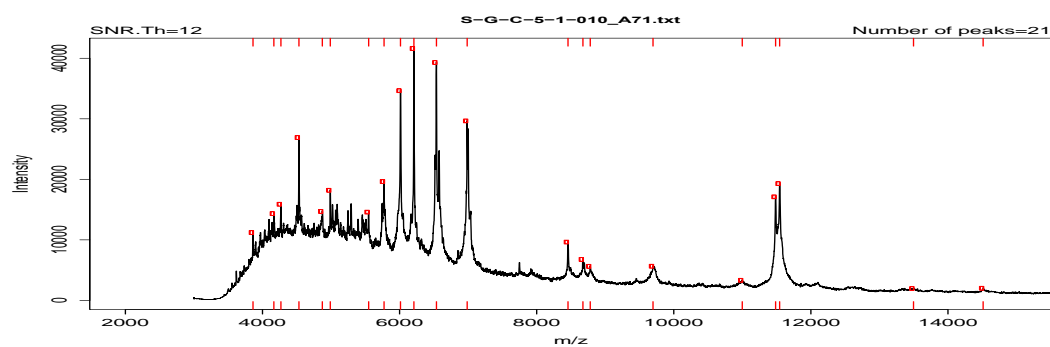


Figura 131. S-G-5. *S. cerevisiae*

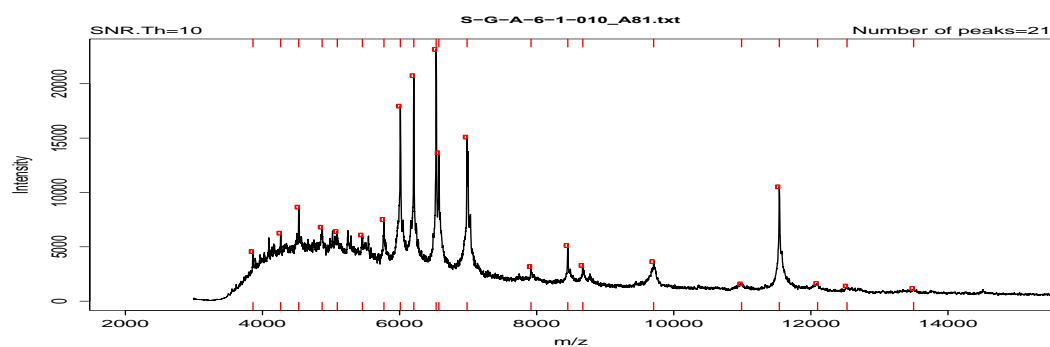


Figura 132. S-G-6. *S. cerevisiae*

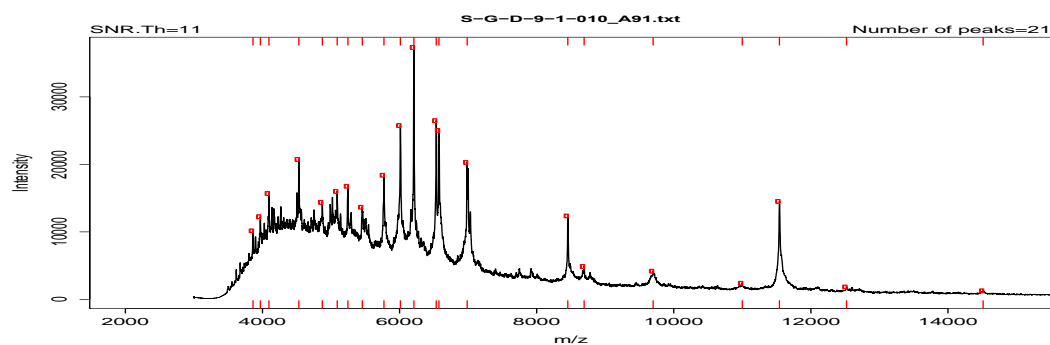


Figura 133. S-G-9. *S. cerevisiae*

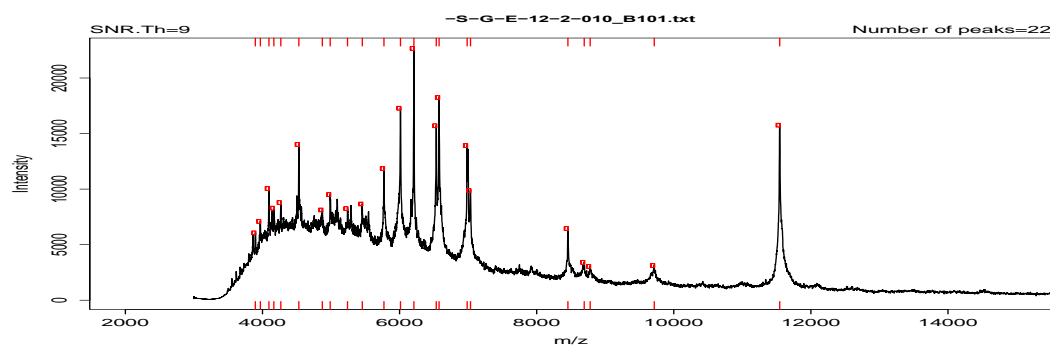


Figura 134. S-G-12. *S. cerevisiae*

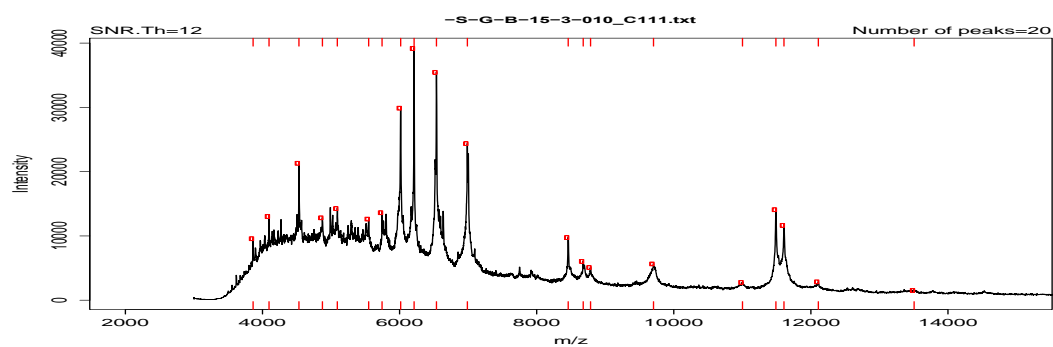


Figura 135. S-G-15. *S. cerevisiae*

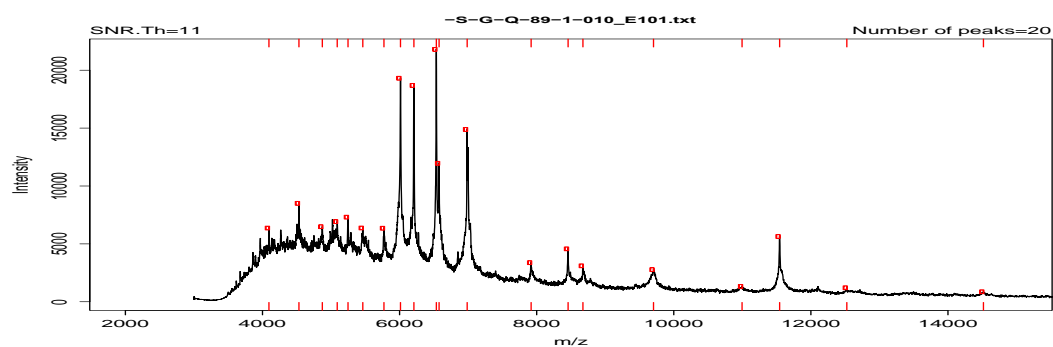


Figura 136. S-G-89. *S. cerevisiae*

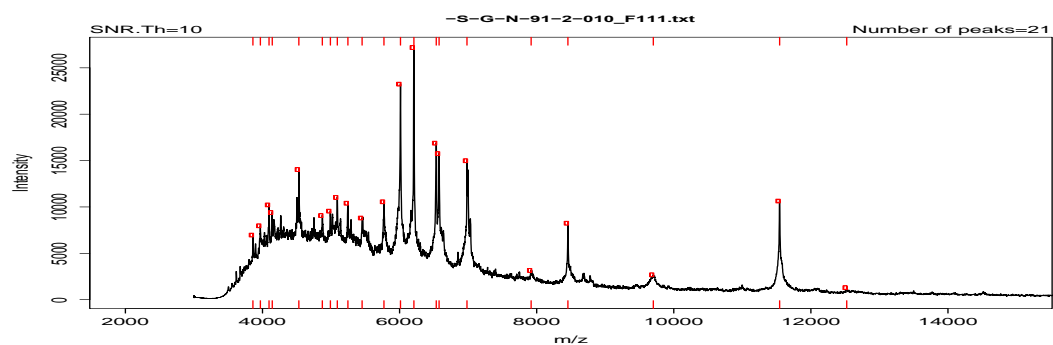


Figura 137. S-G-91. *S. cerevisiae*

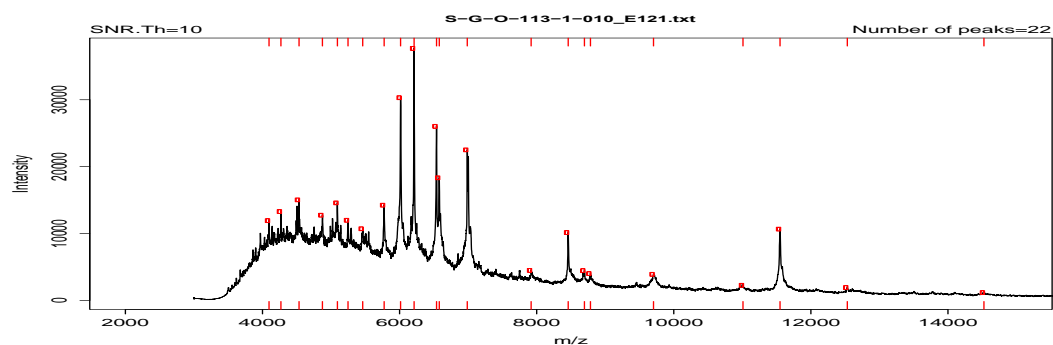


Figura 138. S-G-113. *S. cerevisiae*

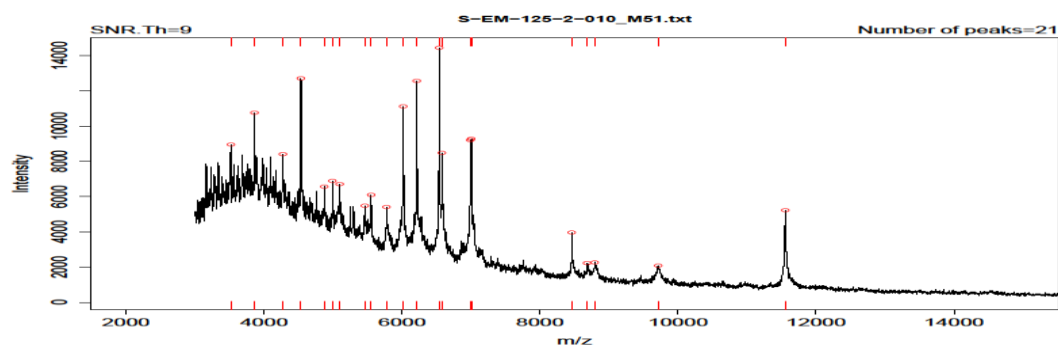


Figura 139. S-EM-125 *S. cerevisiae*

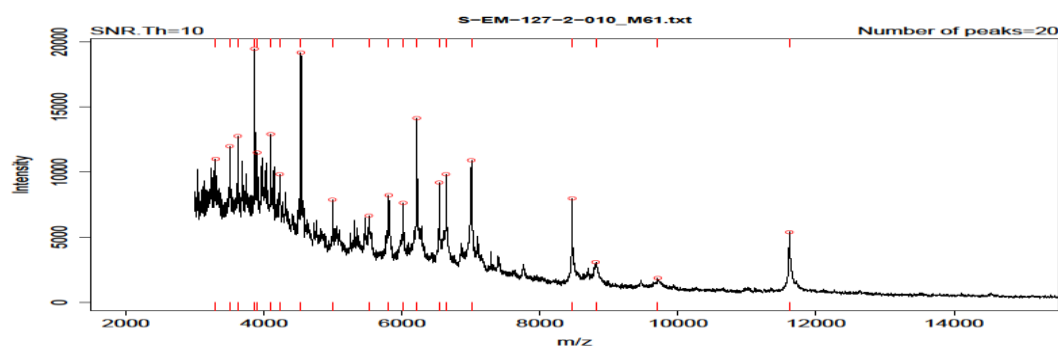


Figura 140. S-EM-127 *S. cerevisiae*

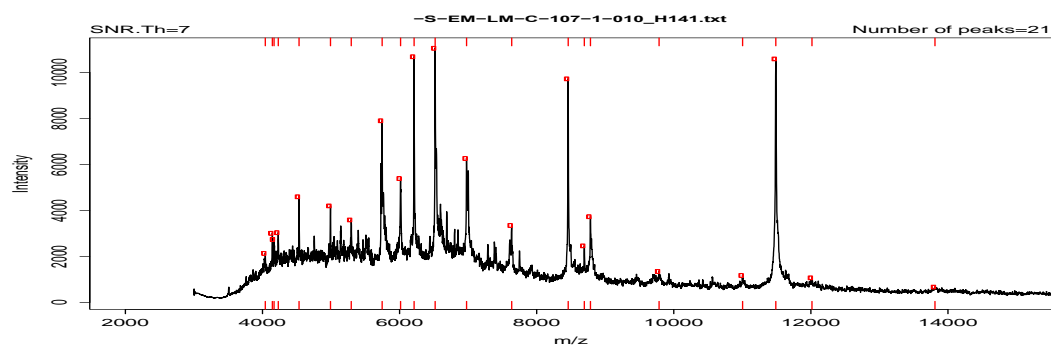


Figura 141. S-EM-107 *S. cerevisiae*

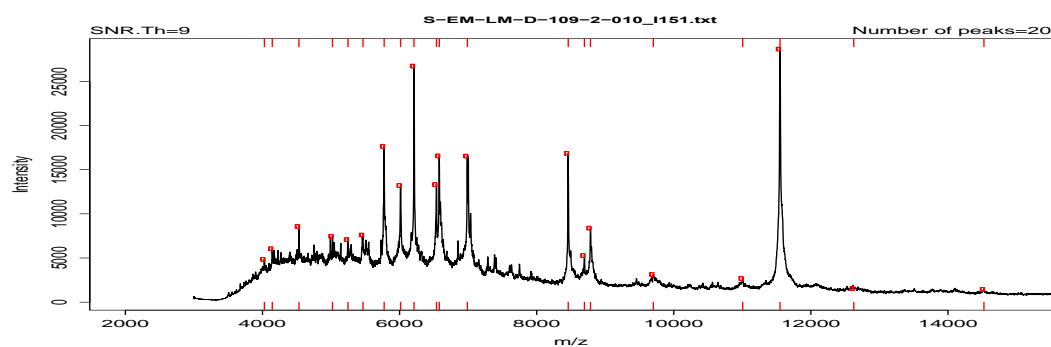


Figura 142. S-EM-109 . *S. cerevisiae*



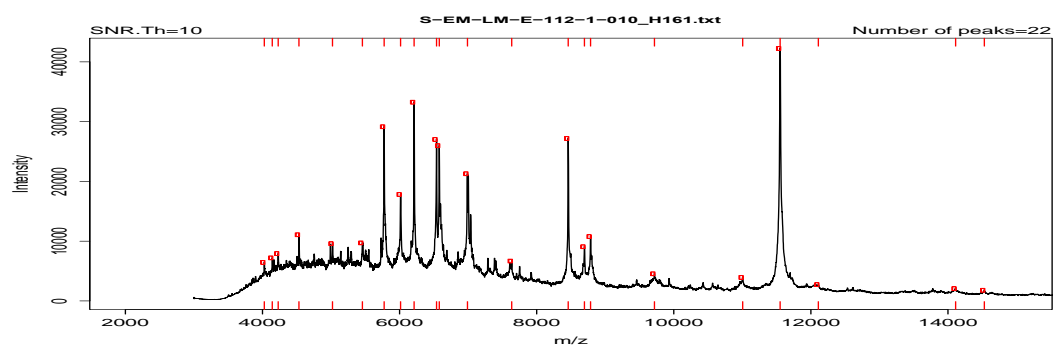


Figura 143. S-EM-112 . *S. cerevisiae*

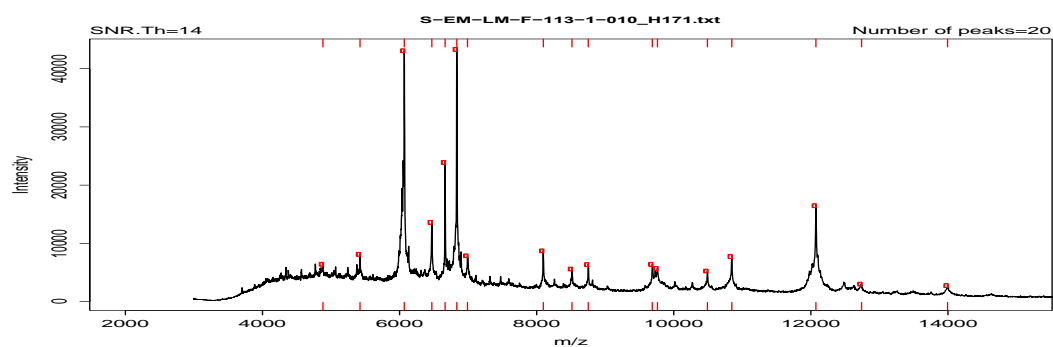


Figura 144. S-EM-113 . *S. cerevisiae*

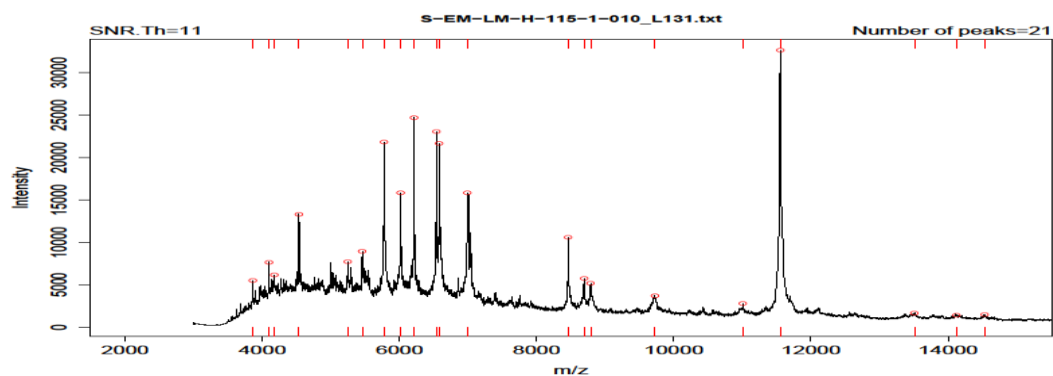


Figura 145. S-EM-115 . *S. cerevisiae*

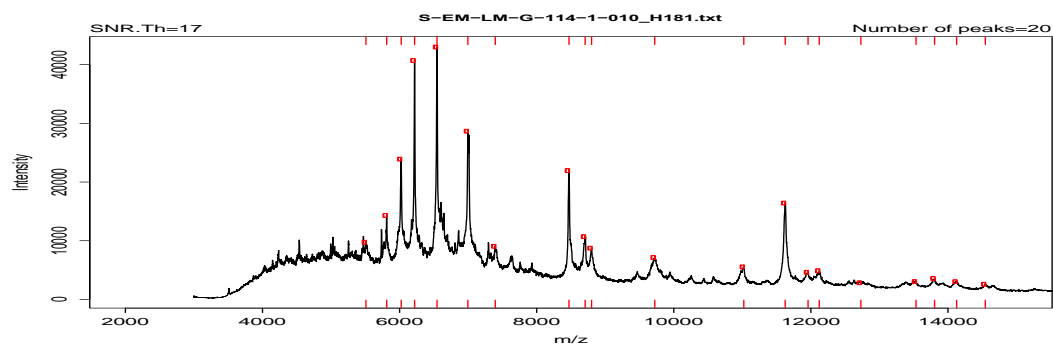


Figura 146. S-EM-114 . *S. cerevisiae*

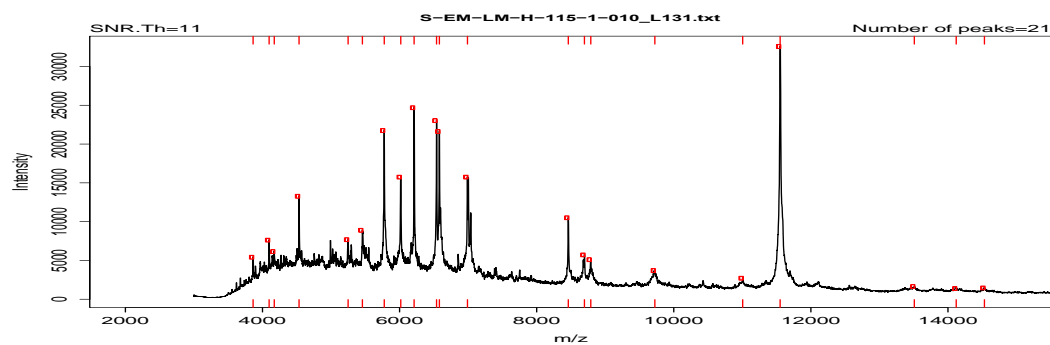


Figura 147. S-EM-116 . *S. cerevisiae*

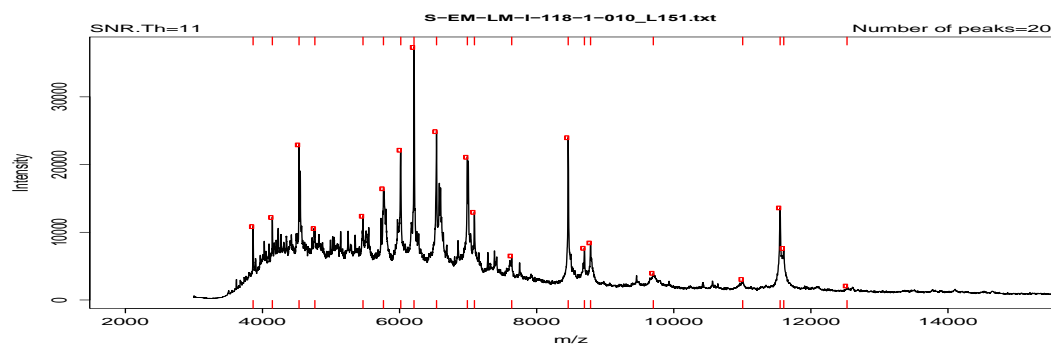


Figura 148. S-EM-118 . *S. cerevisiae*

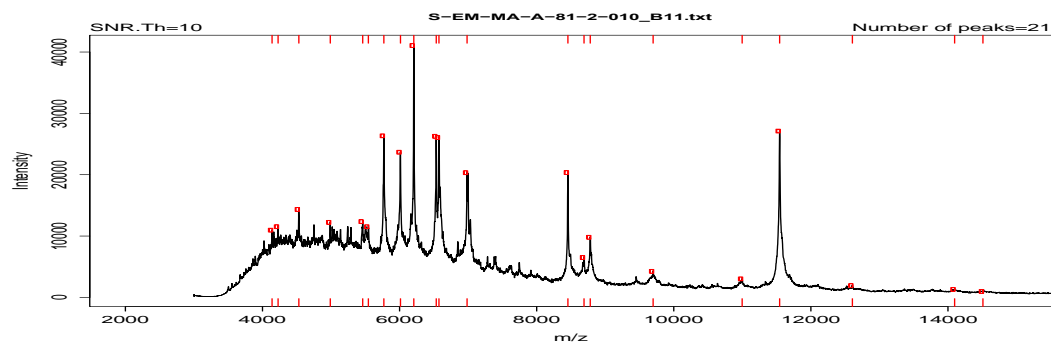


Figura 149. S-EM-81 . *S. cerevisiae*

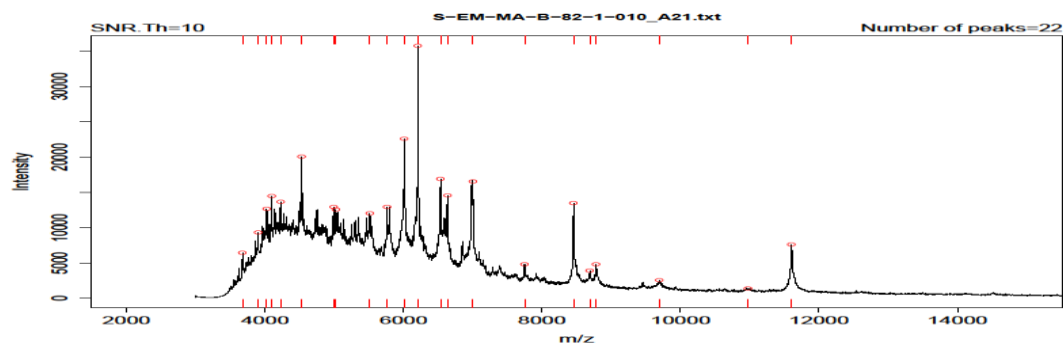


Figura 150. S-EM-82 . *S. cerevisiae*

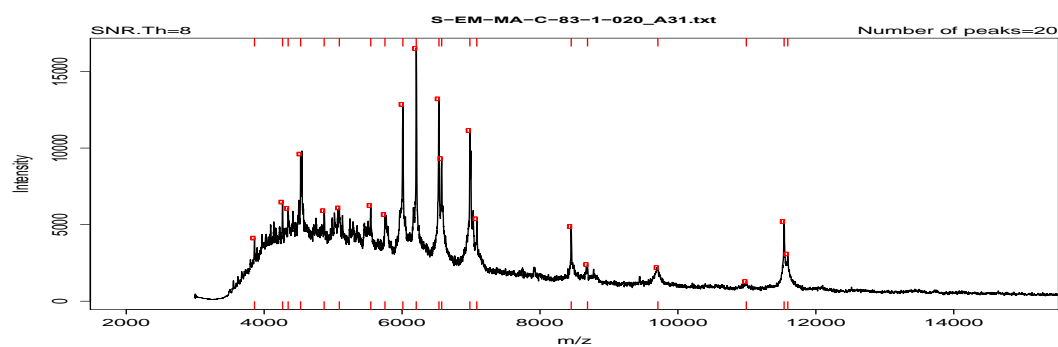


Figura 151. S-EM-83 . *S. cerevisiae*

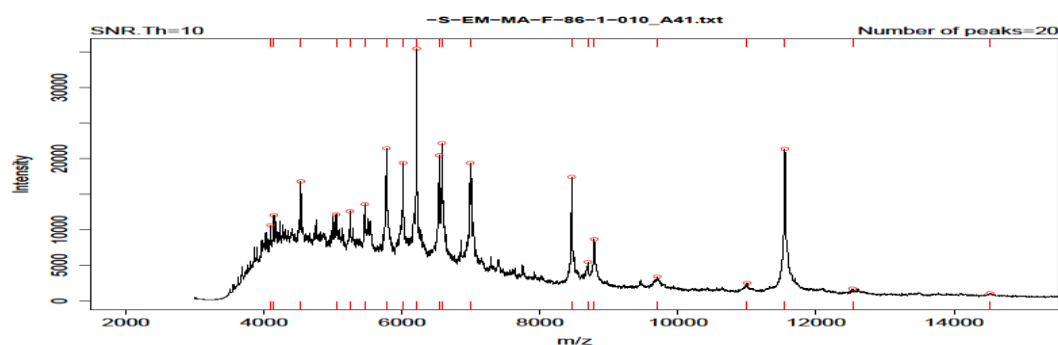


Figura 152. S-EM-86 . *S. cerevisiae*

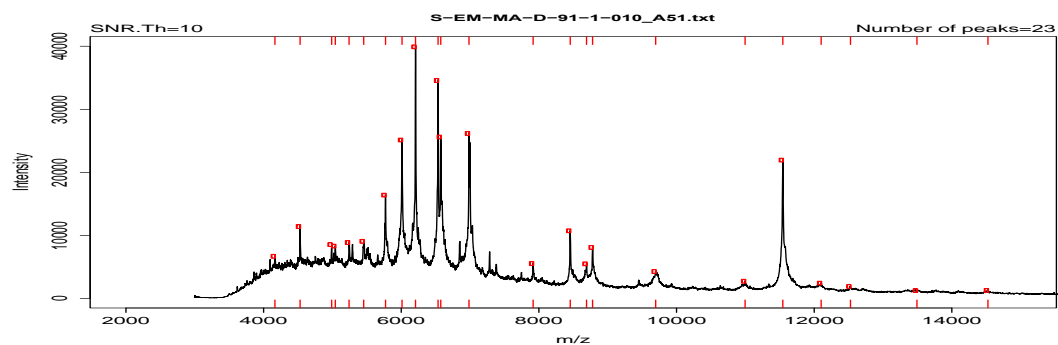


Figura 153. S-EM-91 . *S. cerevisiae*

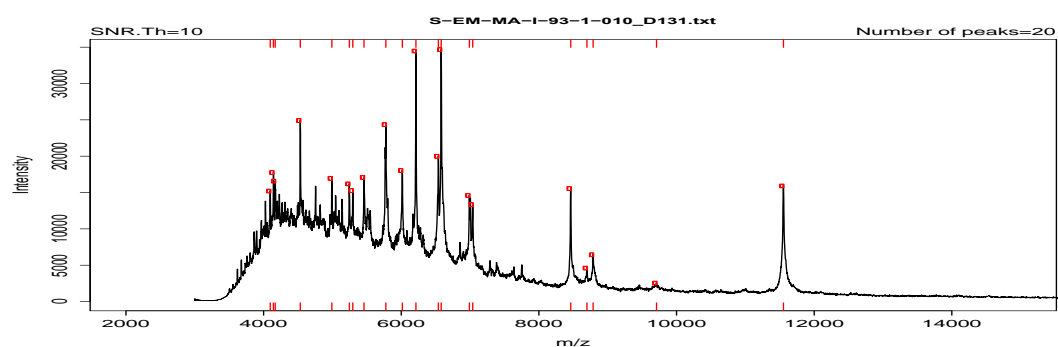


Figura 154- E-EM-93 . *S. cerevisiae*

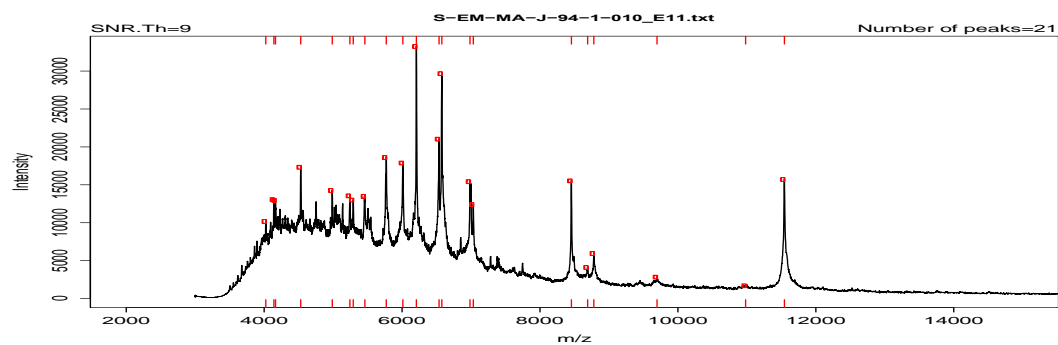


Figura 155. S-EM-94 . *S. cerevisiae*

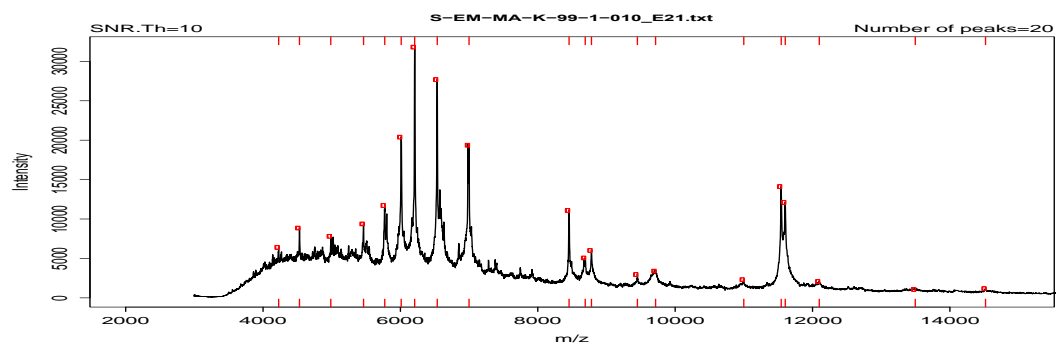


Figura 156. S-EM-99 . *S. cerevisiae*

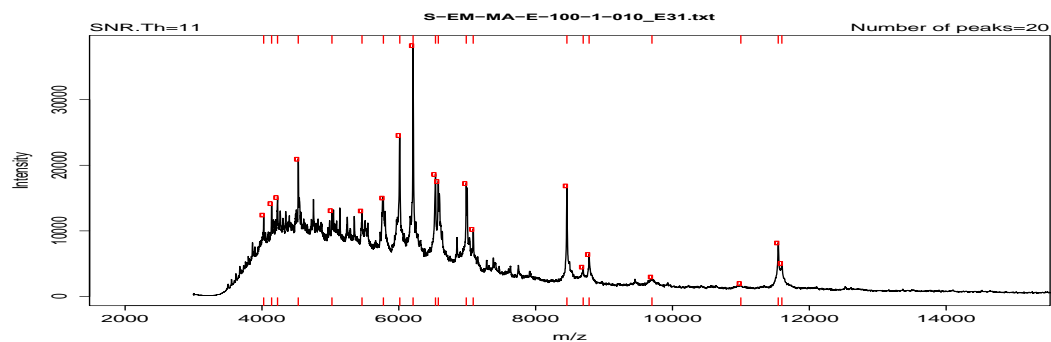


Figura 157. S-EM-100 . *S. cerevisiae*

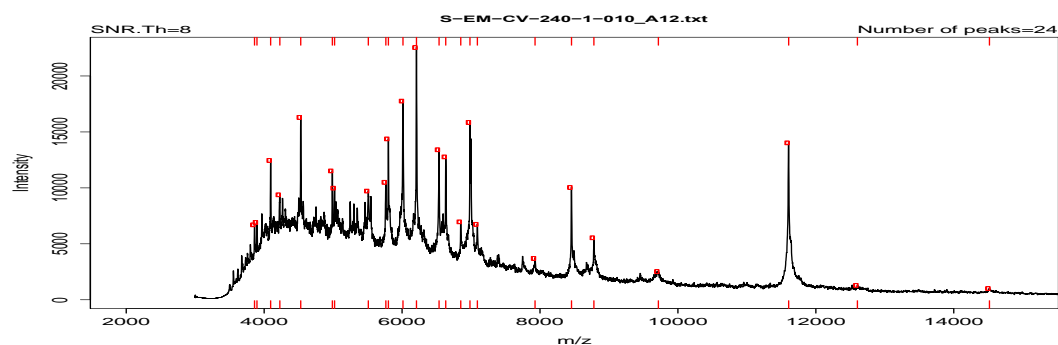


Figura 158. S-EM-240 . *S. cerevisiae*

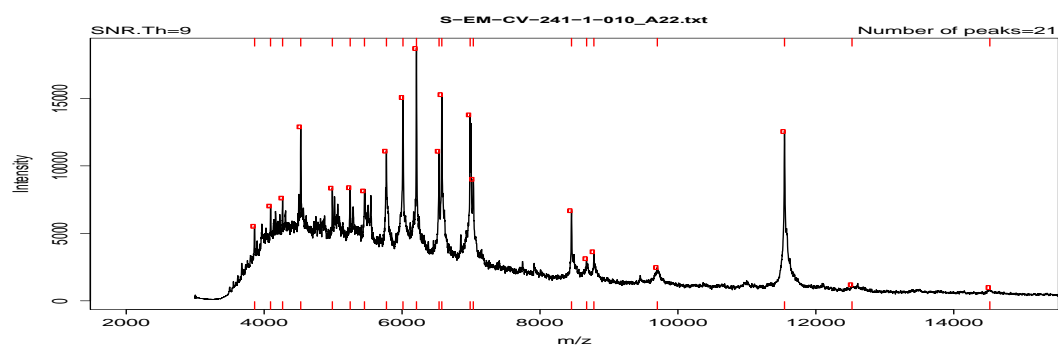


Figura 159. S-EM-241 . *S. cerevisiae*

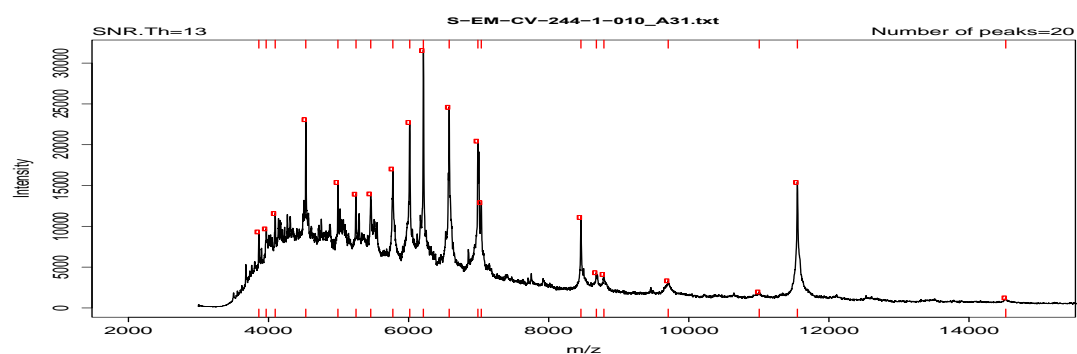


Figura 160. S-EM-244. *S. cerevisiae*

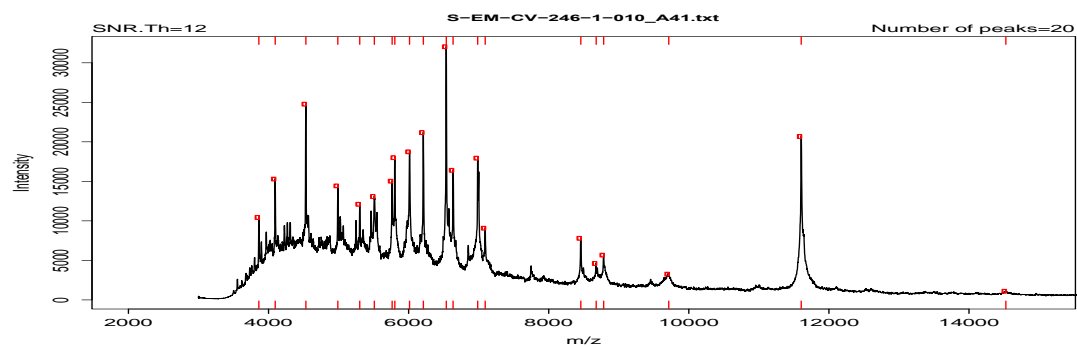


Figura 161. S-EM-246 . *S. cerevisiae*

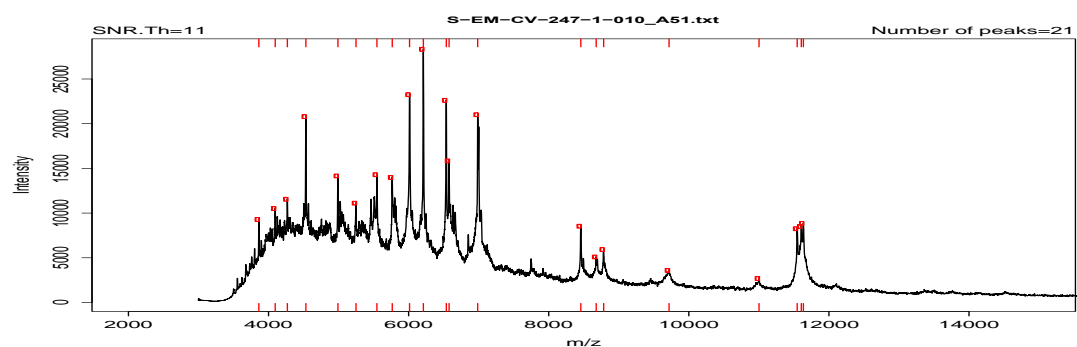


Figura 162. S-EM-247 *S. cerevisiae*

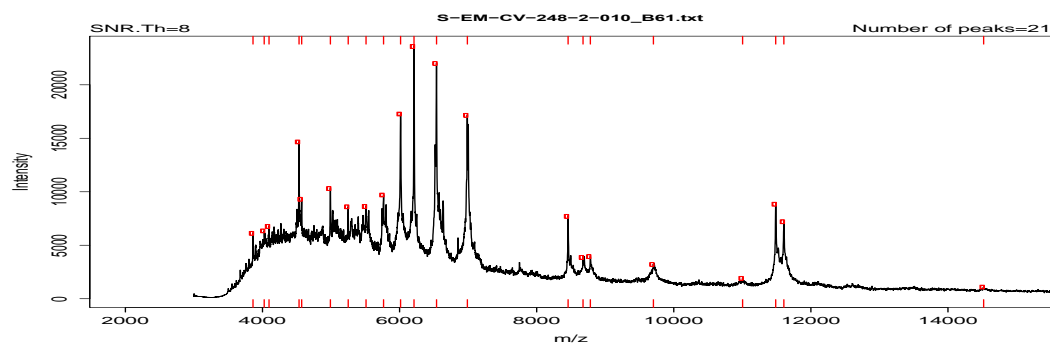


Figura 163. S-EM-248 . *S. cerevisiae*

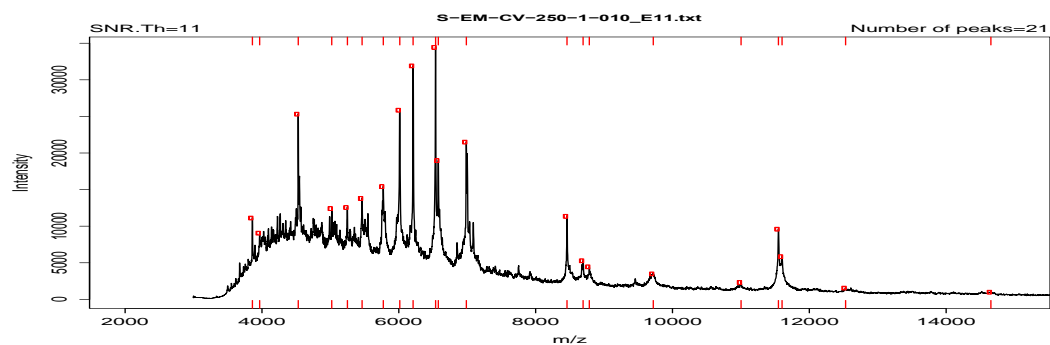


Figura 164. S-EM-250 *S-cerevisiae*

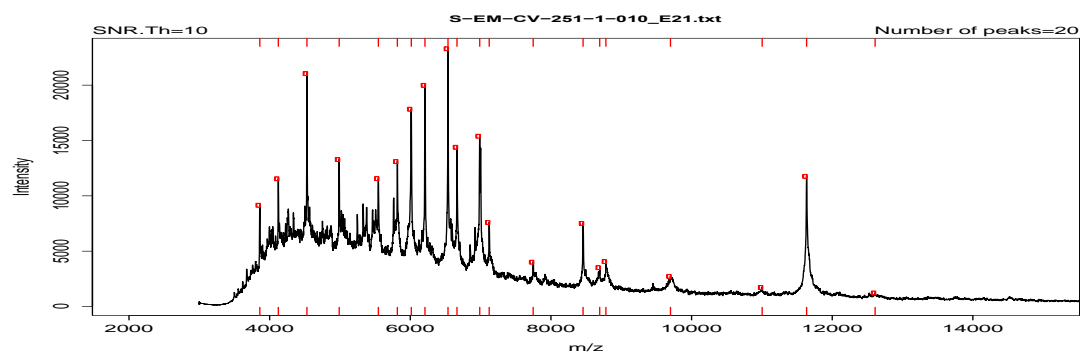


Figura 165. S-EM-251 . *S. cerevisiae*

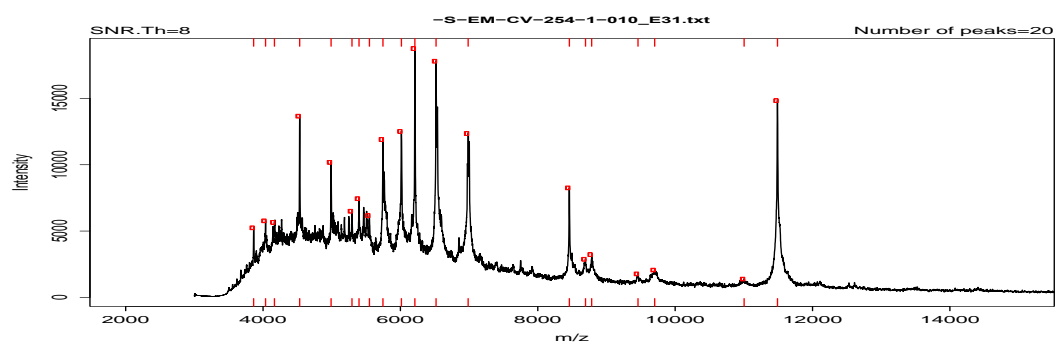


Figura 166. S-EM-254 . *S. cerevisiae*

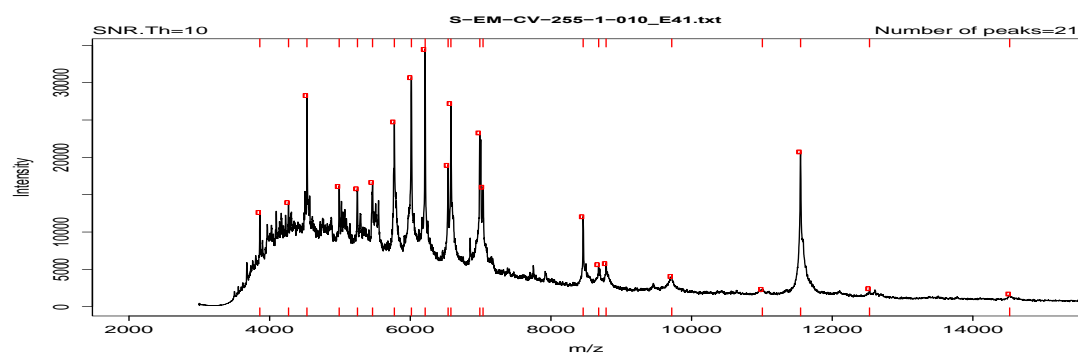


Figura 167. S-EM-255 . *S. cerevisiae*

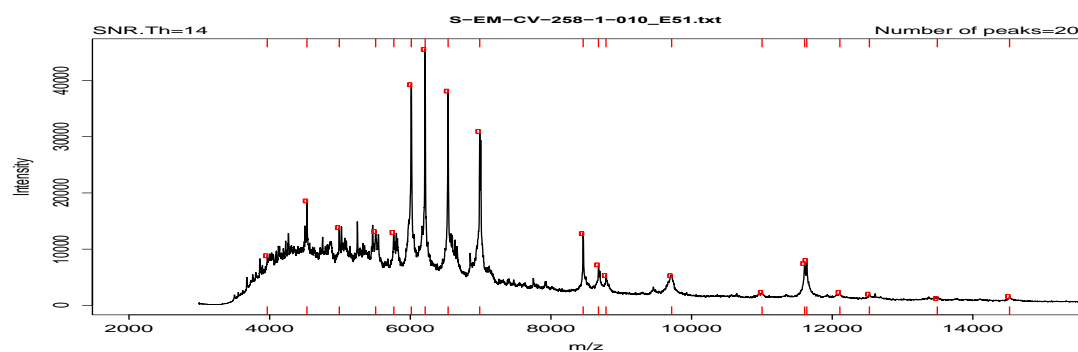


Figura 168. S-EM-258 . *S. cerevisiae*

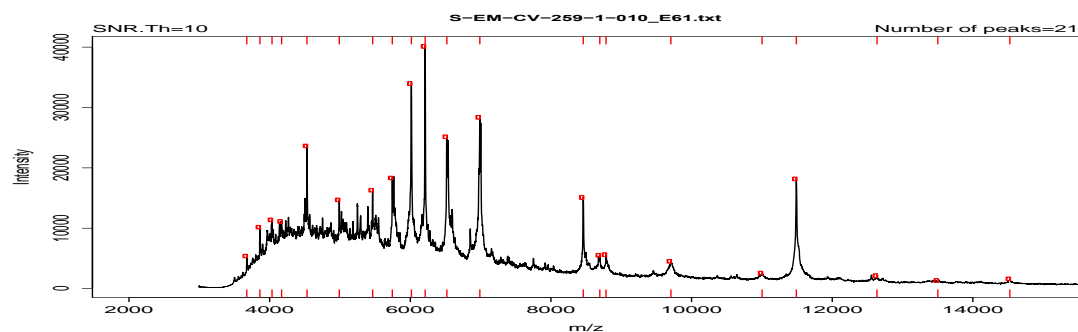


Figura 169. S-EM-259 . *S. cerevisiae*

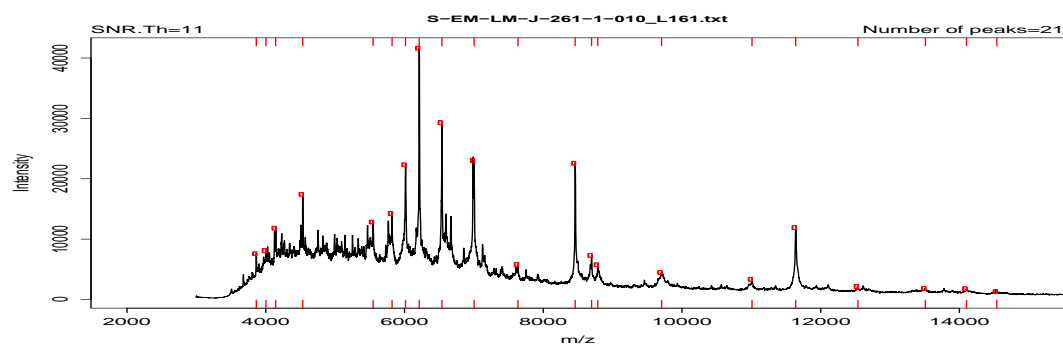


Figura 170. S-EM-261 . *S. cerevisiae*

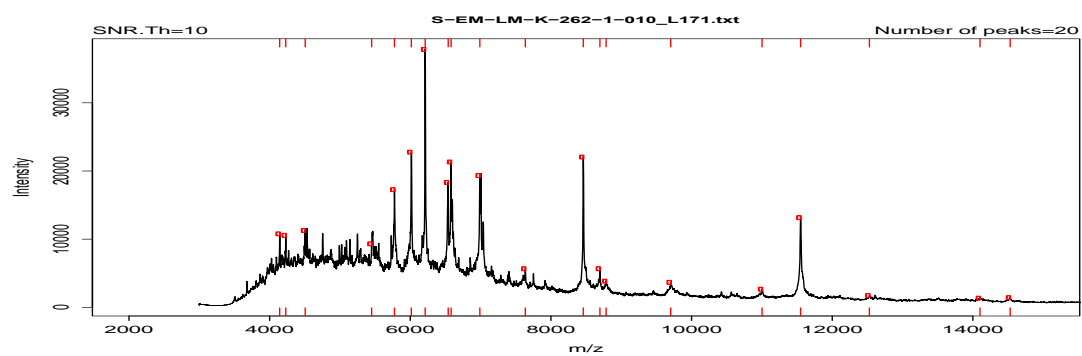


Figura 171. S-EM-262 *S. cerevisiae*

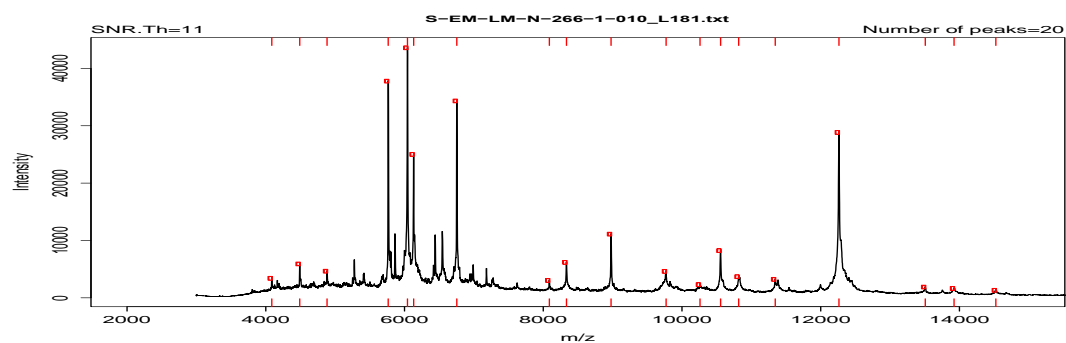


Figura 172. S-EM-266 . *S. cerevisiae*

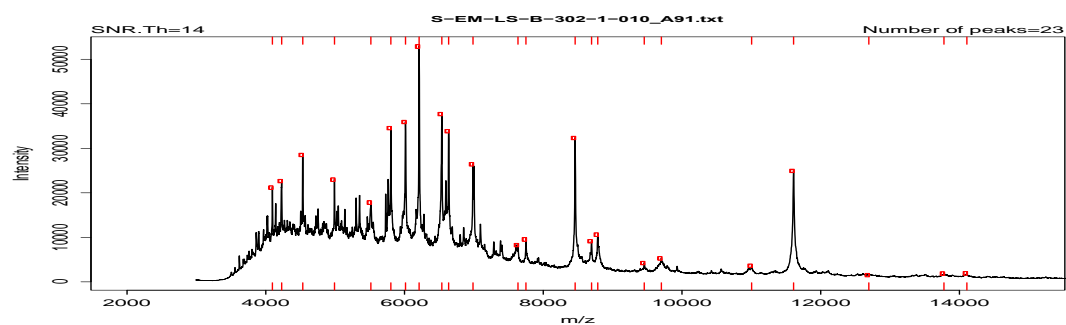


Figura 173. S-EM-302 . *S. cerevisiae*

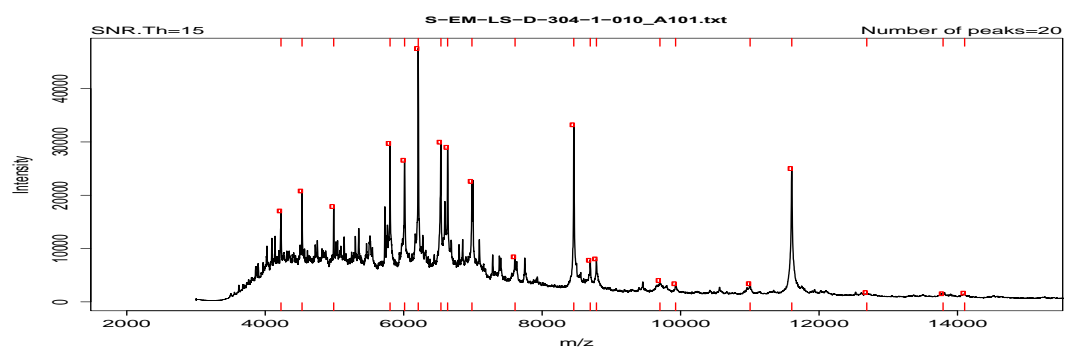


Figura 174. S-EM-304 . *S. cerevisiae*



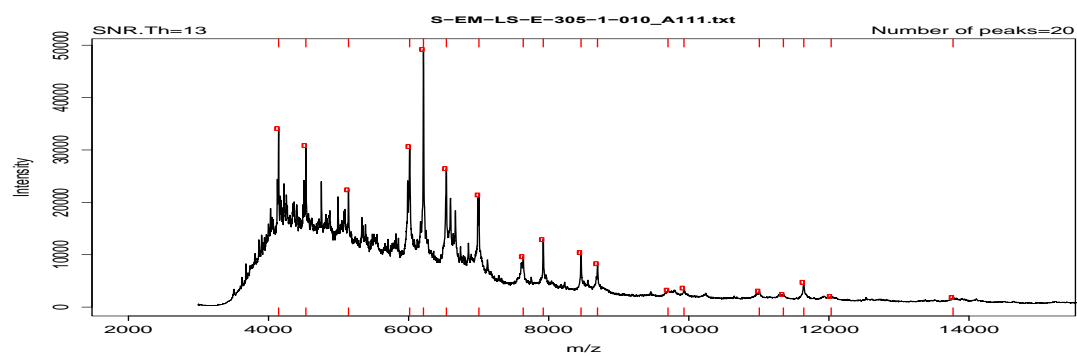


Figura 175. S-EM-305 . *S. cerevisiae*

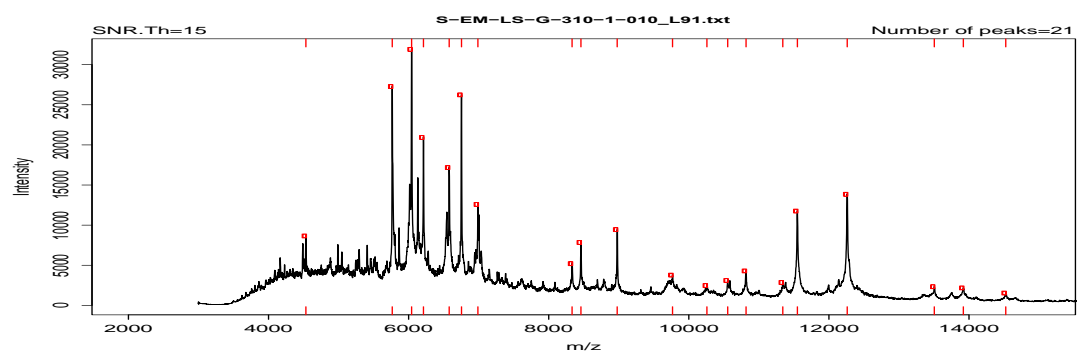


Figura 176. S-EM-310 . *S. cerevisiae*

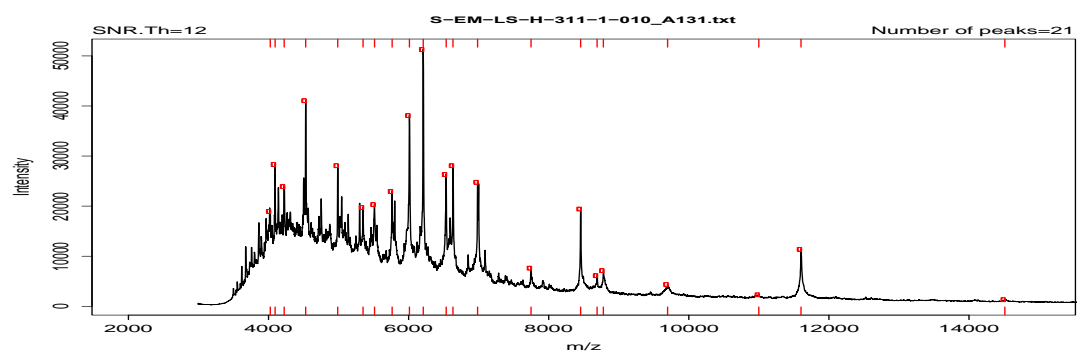


Figura 177. S-EM-311 *S. cerevisiae*

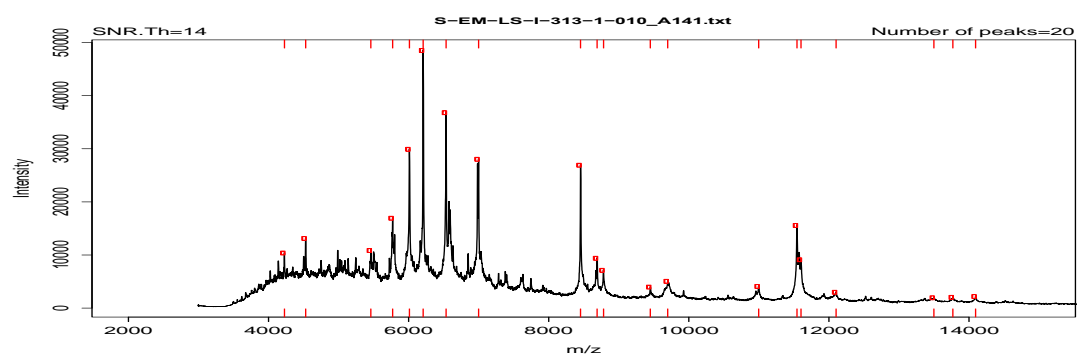


Figura 178. S-EM-313 . *S. cerevisiae*

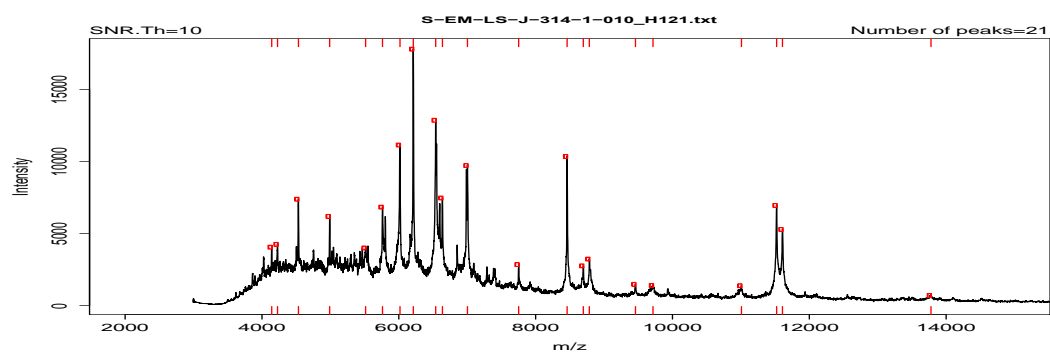


Figura 179. S-EM-314 . *S. cerevisiae*

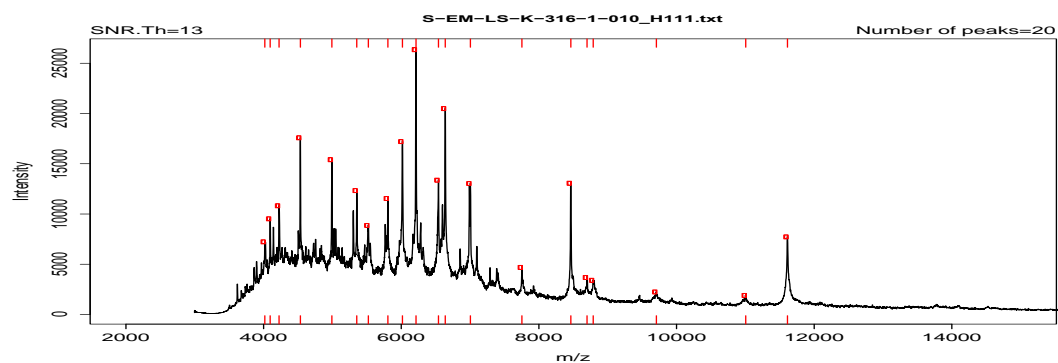


Figura 180. S-EM-316 . *S. cerevisiae*

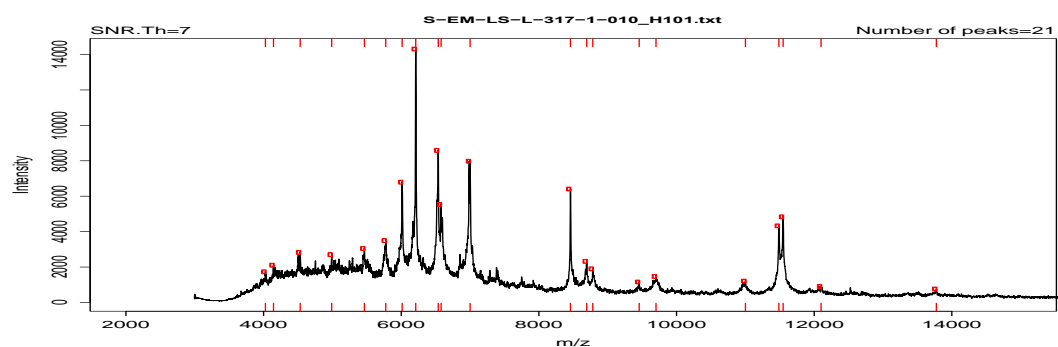


Figura 181. S-EM-317 . *S. cerevisiae*

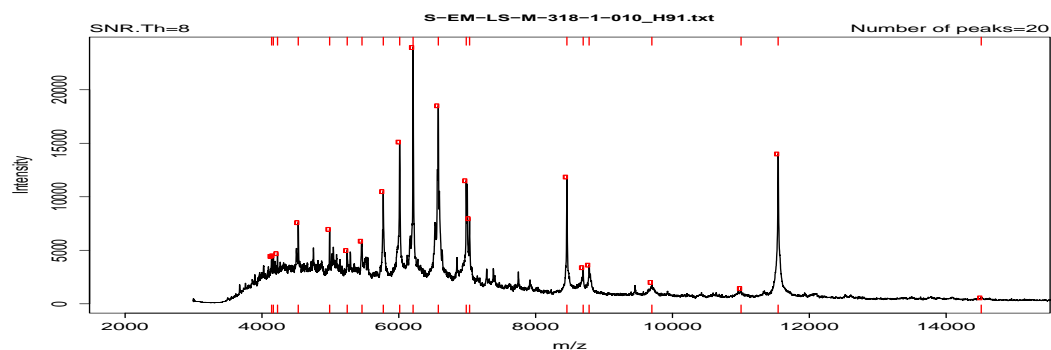


Figura 182. S-EM-318 . *S. cerevisiae*

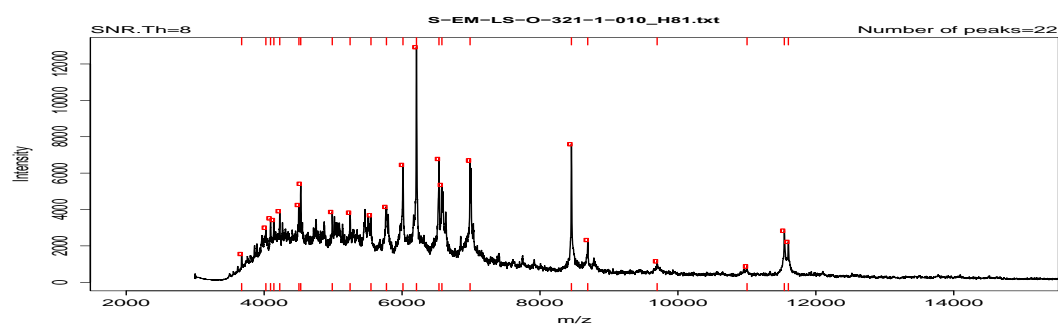


Figura 183. S-EM-321 . *S. cerevisiae*

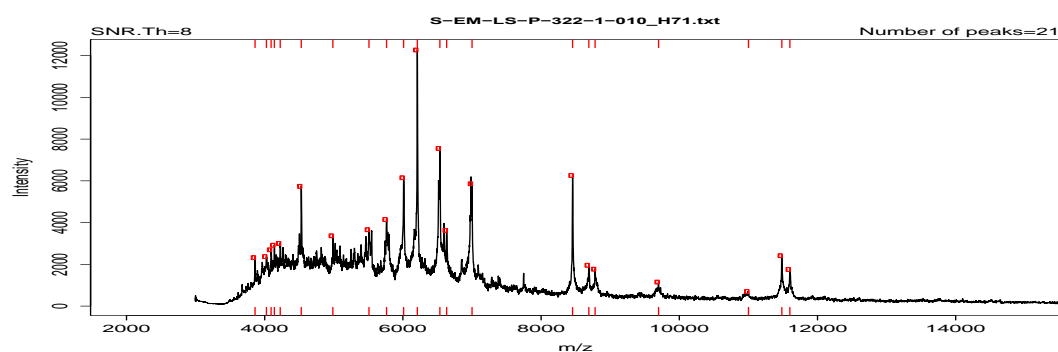


Figura 184. S-EM-322 . *S. cerevisiae*

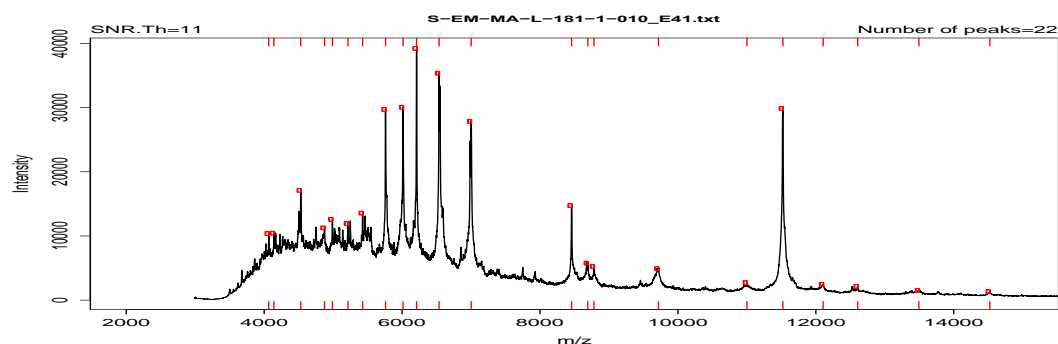


Figura 185. S-EM-181 . *S. cerevisiae*

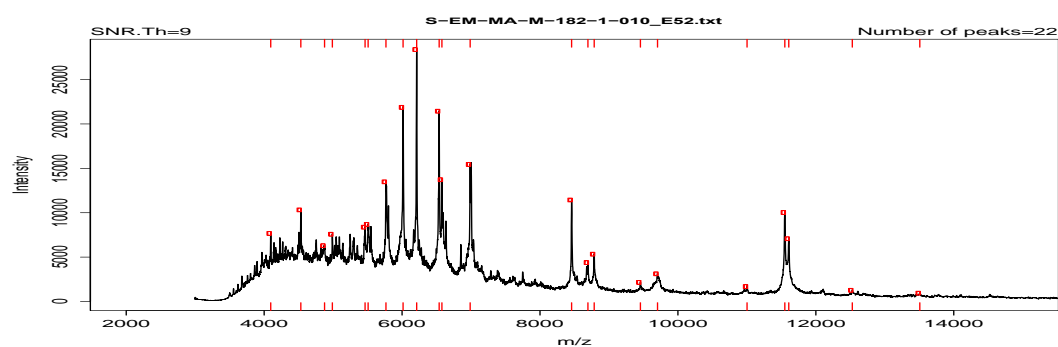


Figura 186. S-EM-182 . *S. cerevisiae*

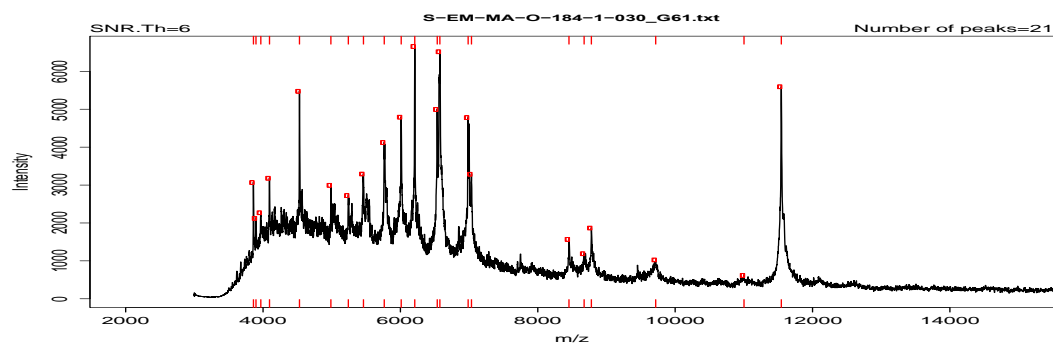


Figura 187. S-EM-184 . *S. cerevisiae*

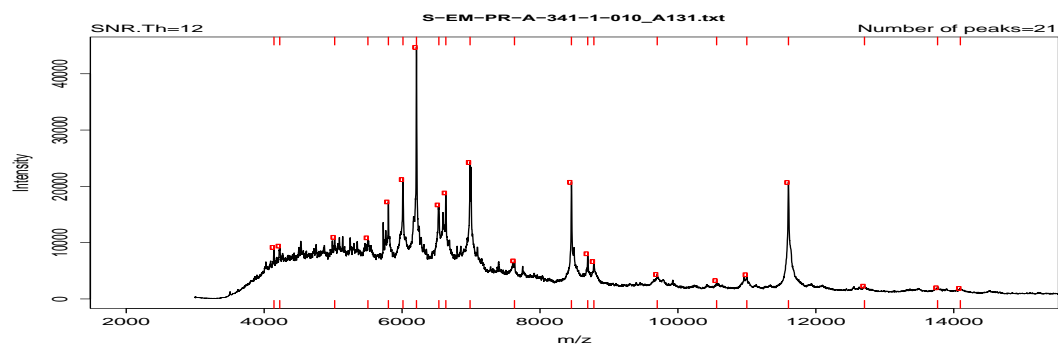


Figura 188. S-EM-341 . *S. cerevisiae*

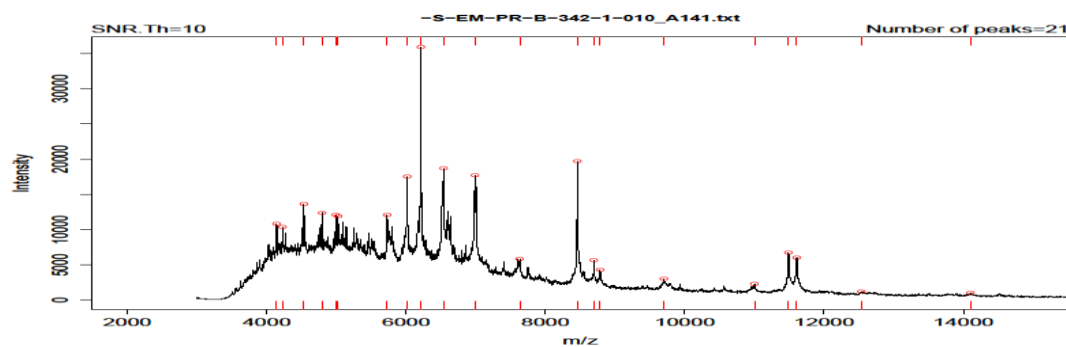


Figura 189. S-EM-342 . *S. cerevisiae*

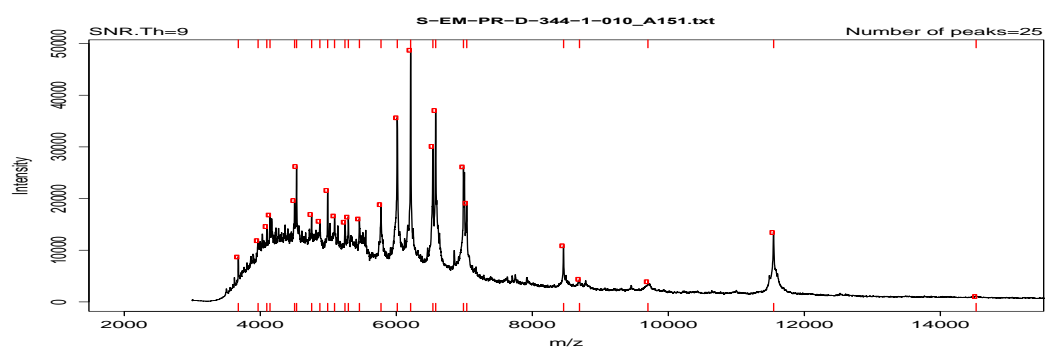


Figura 190. S-EM-344 . *S. cerevisiae*

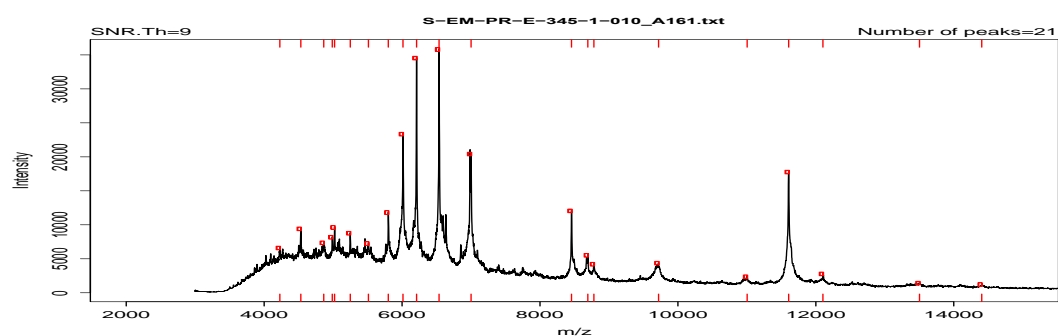


Figura 191. S-EM-345 . *S. cerevisiae*

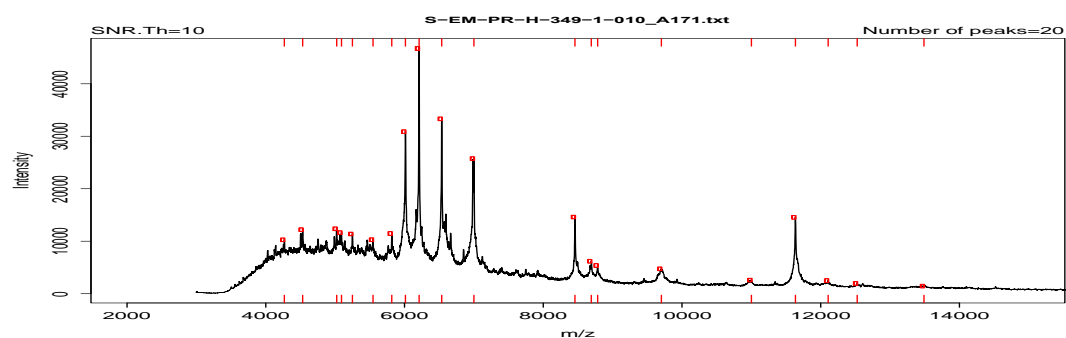


Figura 192. S-EM-349 . *S. cerevisiae*

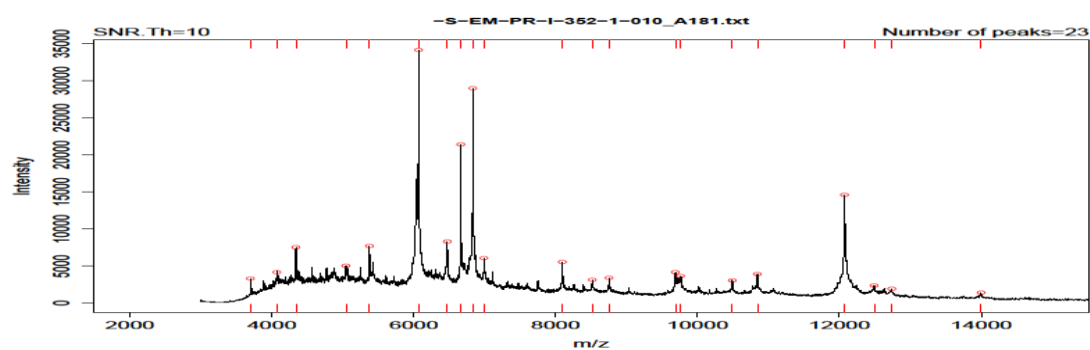


Figura 193. S-EM-352 . *S. cerevisiae*

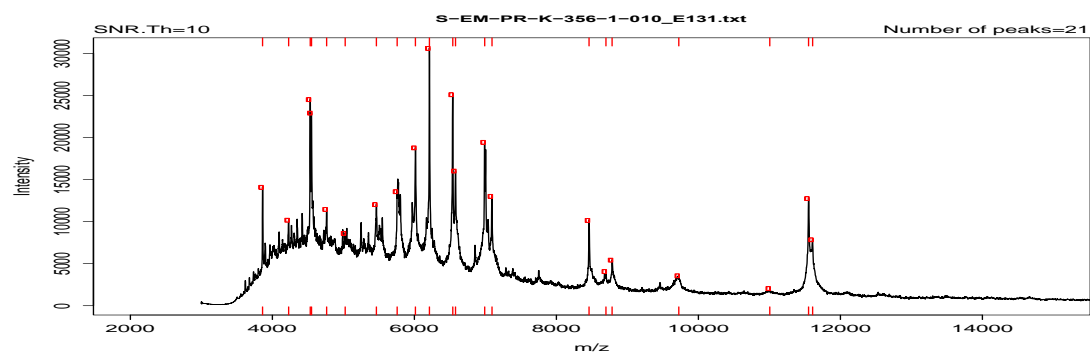


Figura 194. S-EM-356 . *S. cerevisiae*

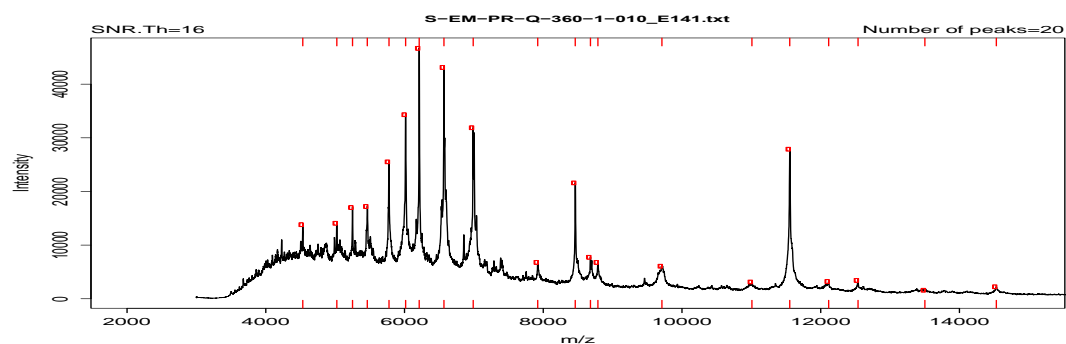


Figura 195. S-EM-360 . *S. cerevisiae*

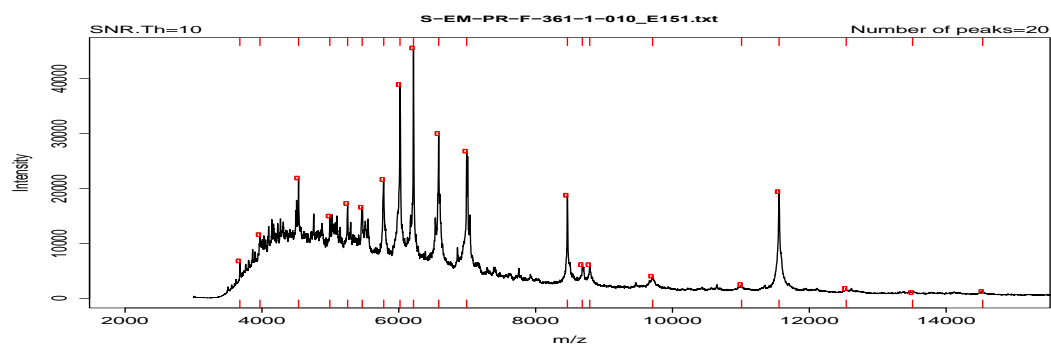


Figura 196. S-EM-361 . *S. cerevisiae*

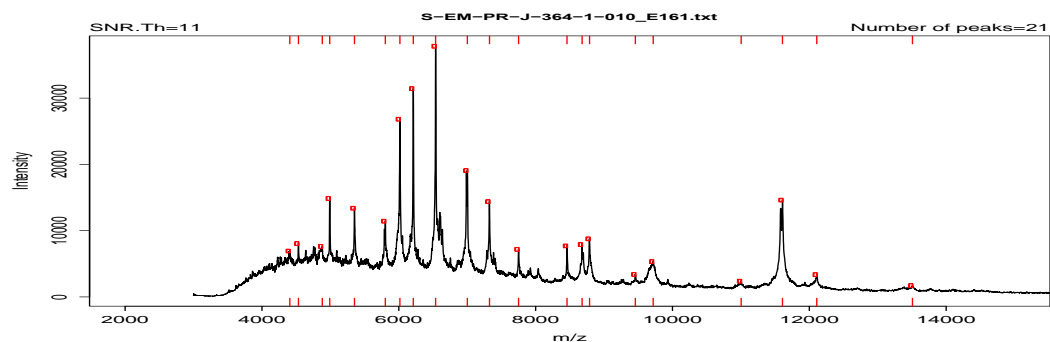


Figura 197. S-EM-364 . *S. cerevisiae*

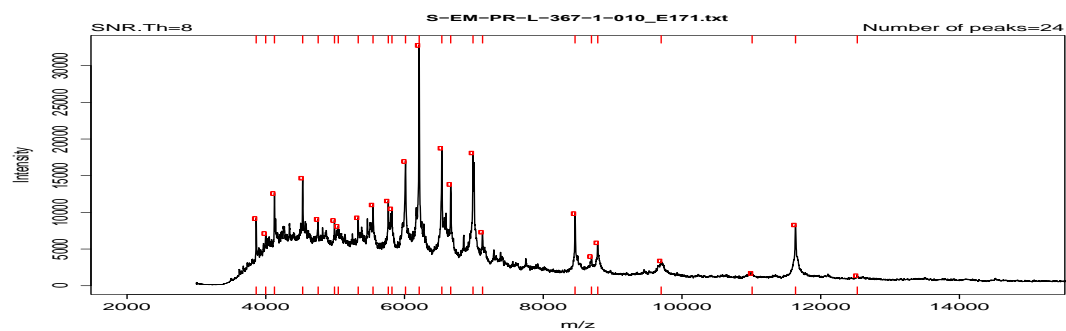


Figura 198. S-EM-367 . *S. cerevisiae*

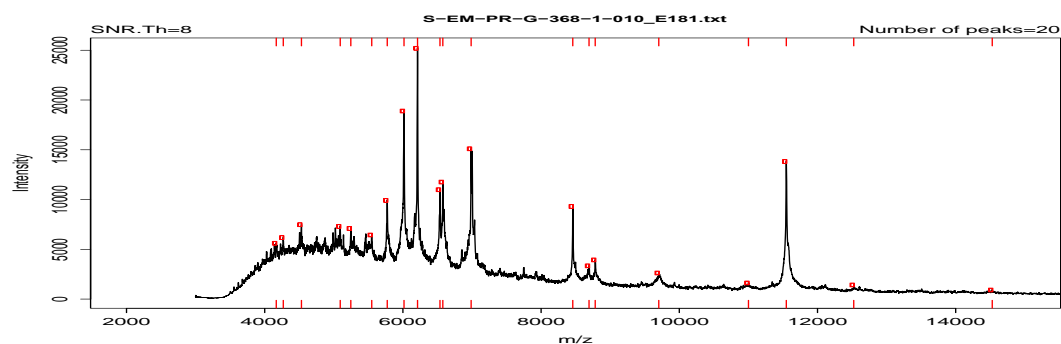


Figura 199. S-EM-368 . *S. cerevisiae*

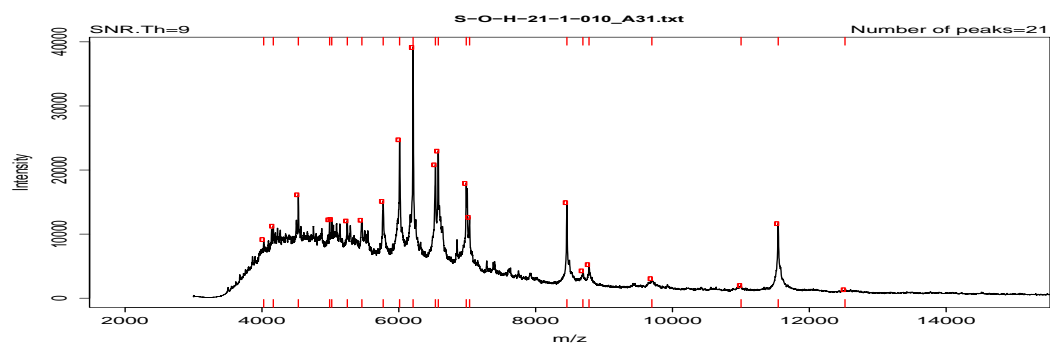


Figura 200. S-O-21 . *S. cerevisiae*

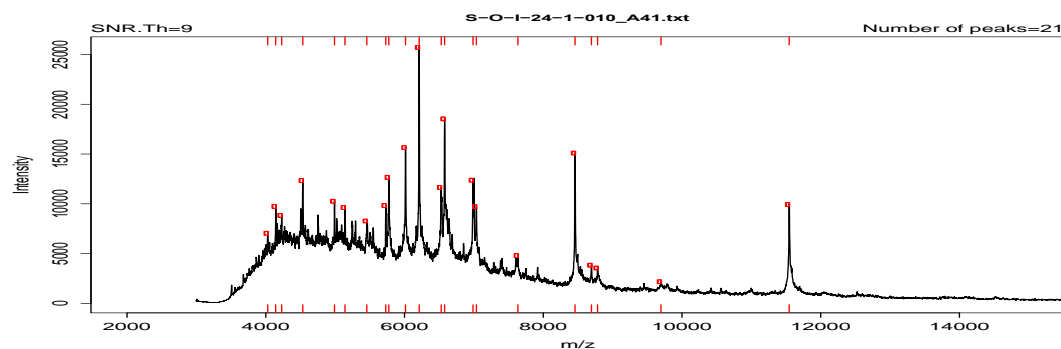


Figura 201. S-O-24 . *S. cerevisiae*

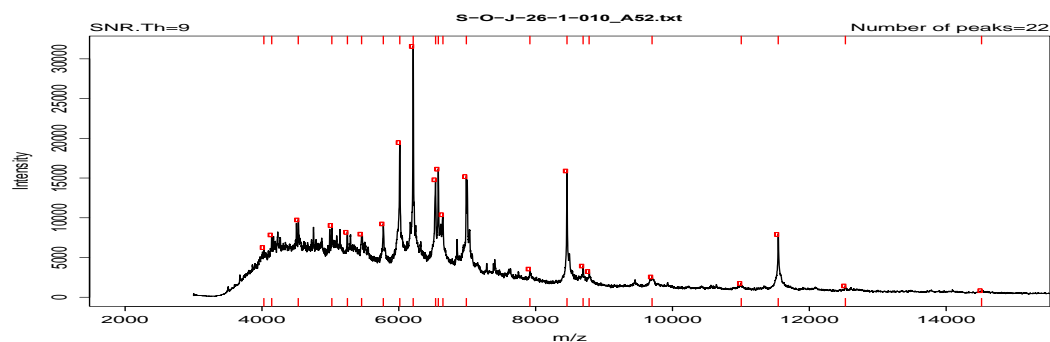


Figura 202. S-O-26 . *S. cerevisiae*

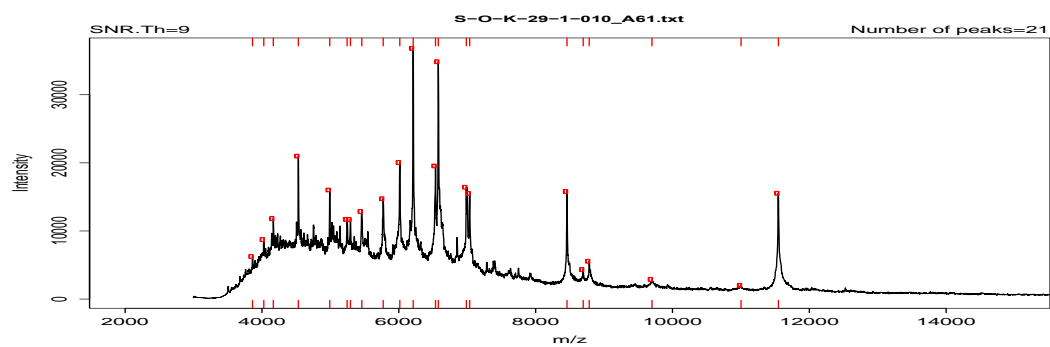


Figura 203. S-O-29 . *S. cerevisiae*

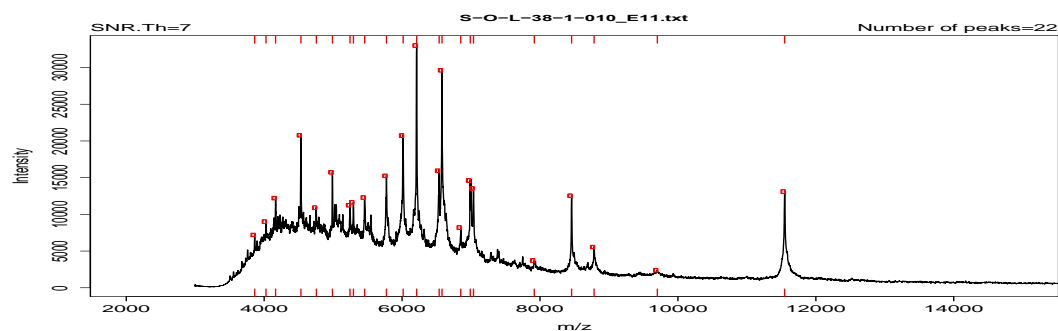


Figura 204. S-O-38 . *S. cerevisiae*

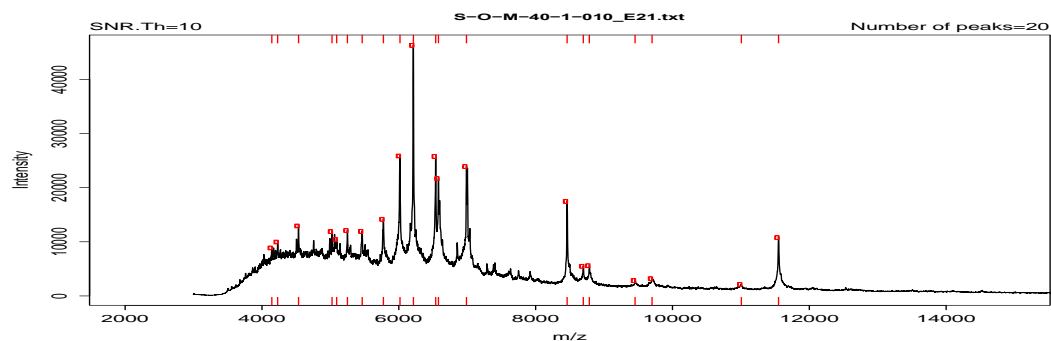


Figura 205. S-O-40 . *S. cerevisiae*

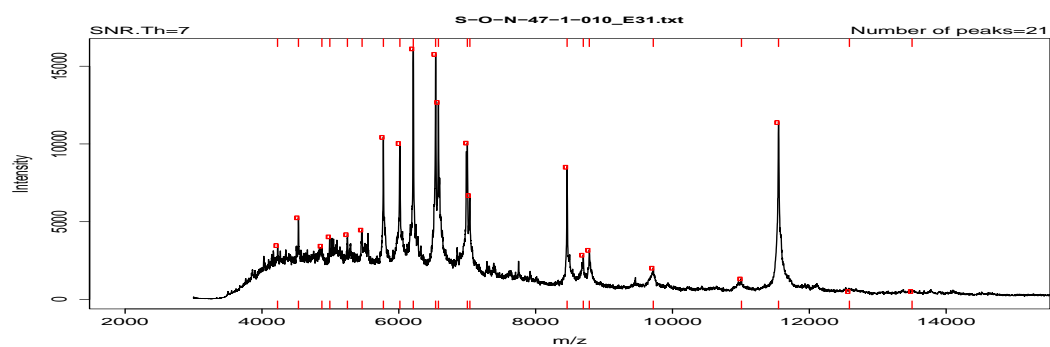


Figura 206. S-O-47 *S. cerevisiae*



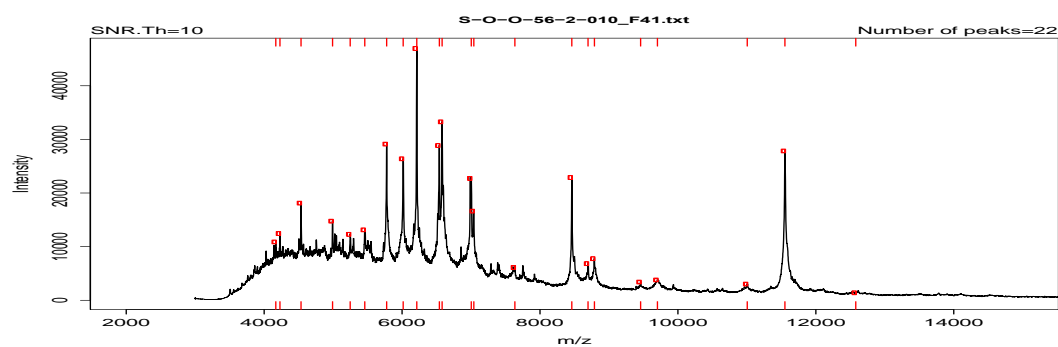


Figura 207. S-O-56 . *S. cerevisiae*

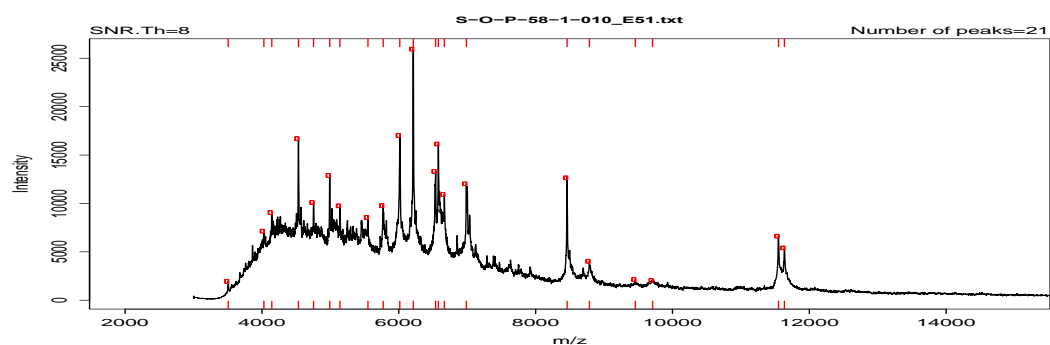


Figura 208. S-O-58 . *S. cerevisiae*

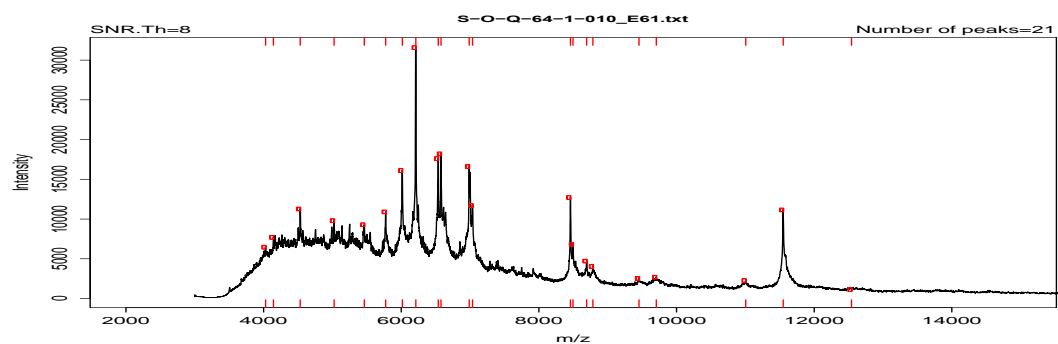


Figura 209. S-O-64 . *S. cerevisiae*

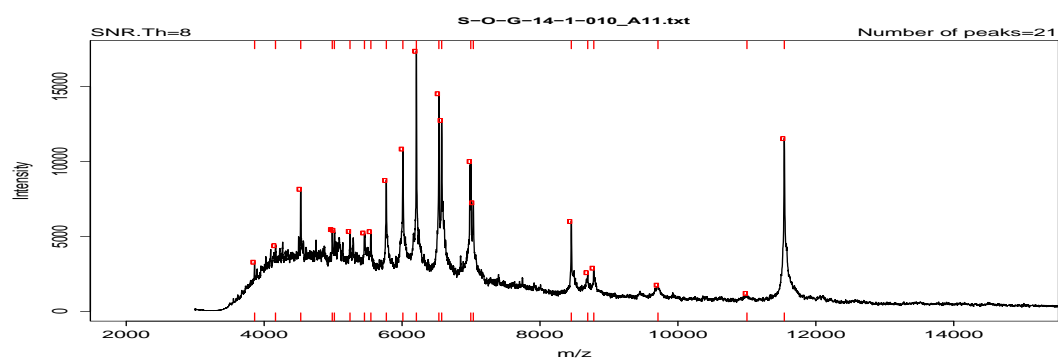


Figura 210. S-O-14 . *S. cerevisiae*

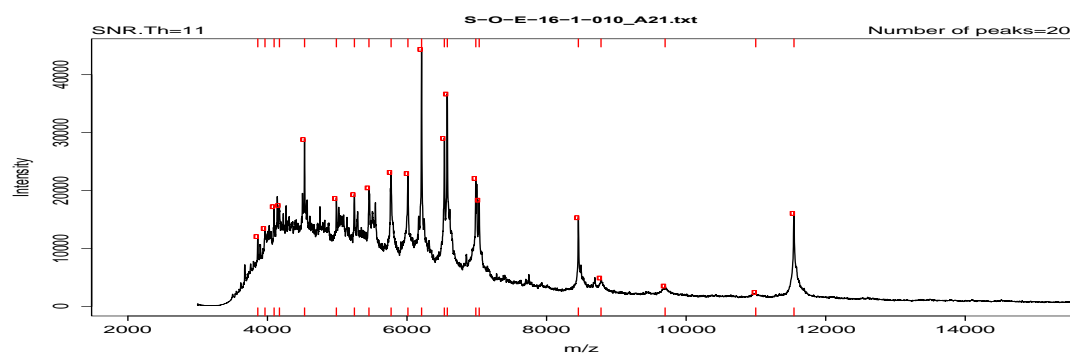


Figura 211. S-O-16 . *S. cerevisiae*

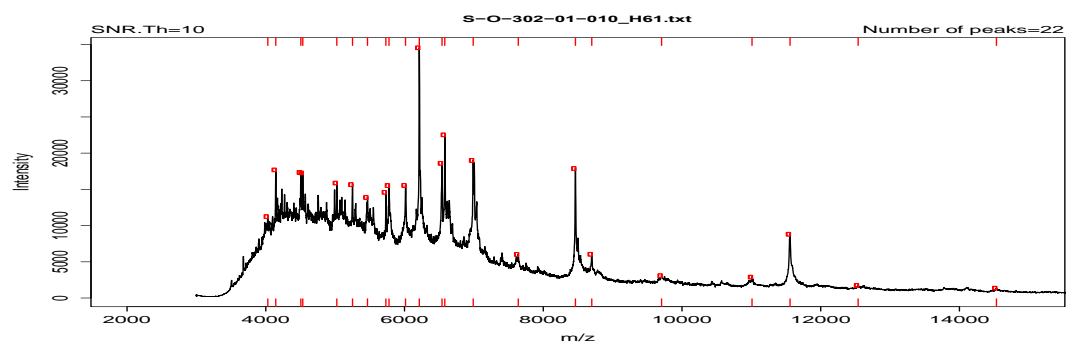


Figura 212. S-O-302 . *S. cerevisiae*

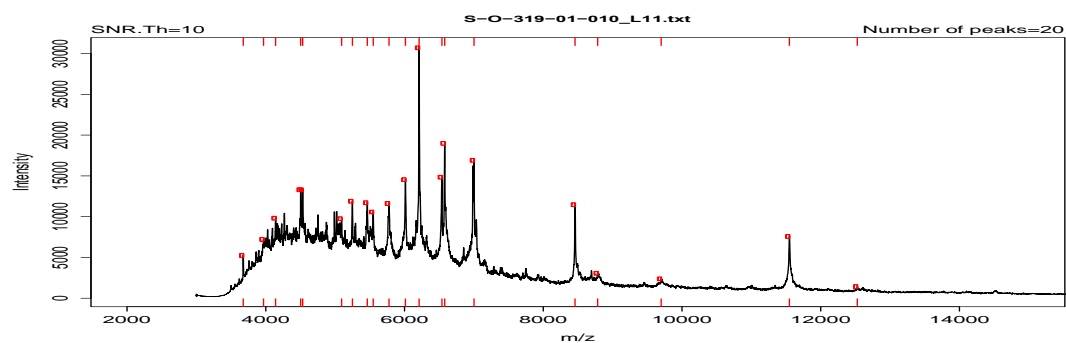


Figura 213. S-O-319 . *S. cerevisiae*

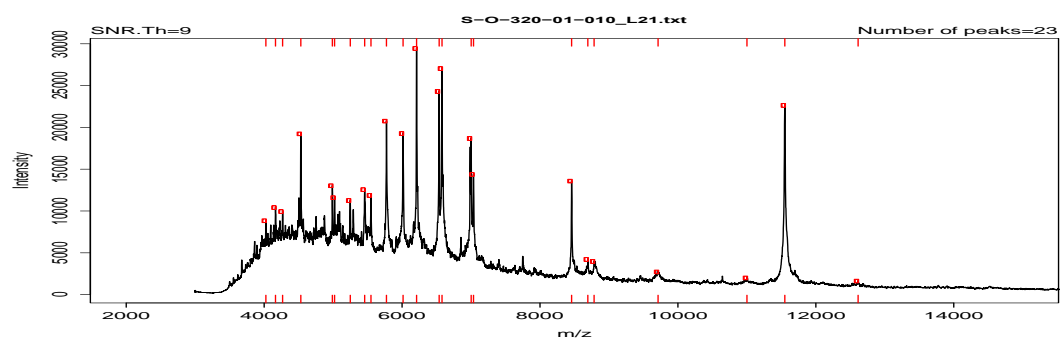


Figura 214. S-O-320 . *S. cerevisiae*

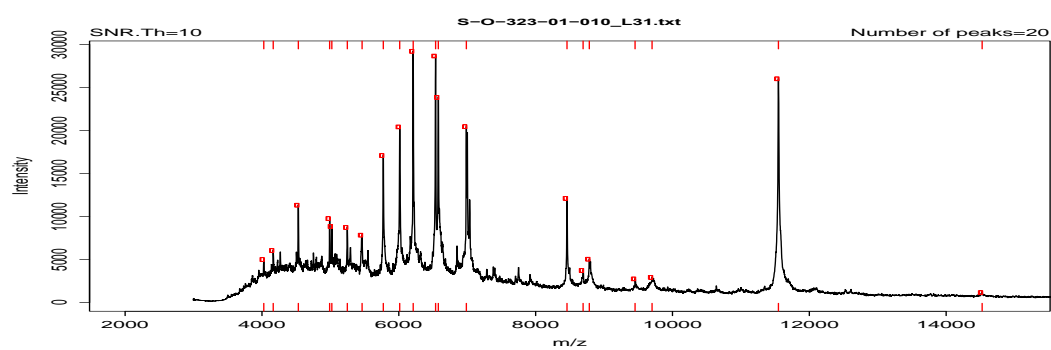


Figura 215. S-O-323 . *S. cerevisiae*

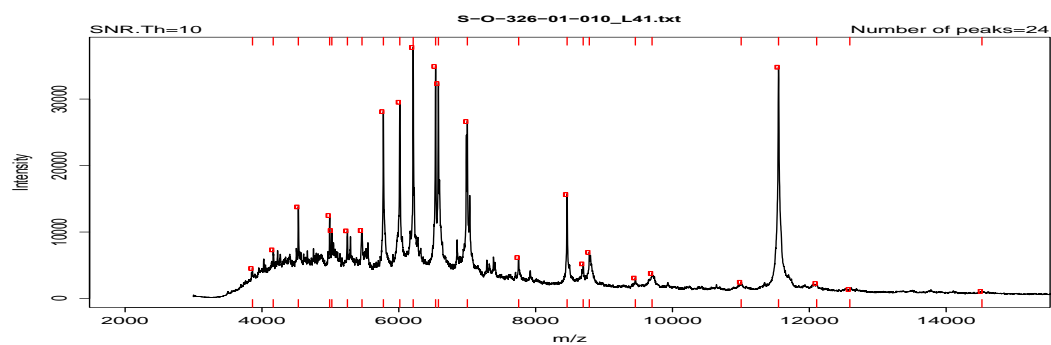


Figura 216. S-O-326 . *S. cerevisiae*

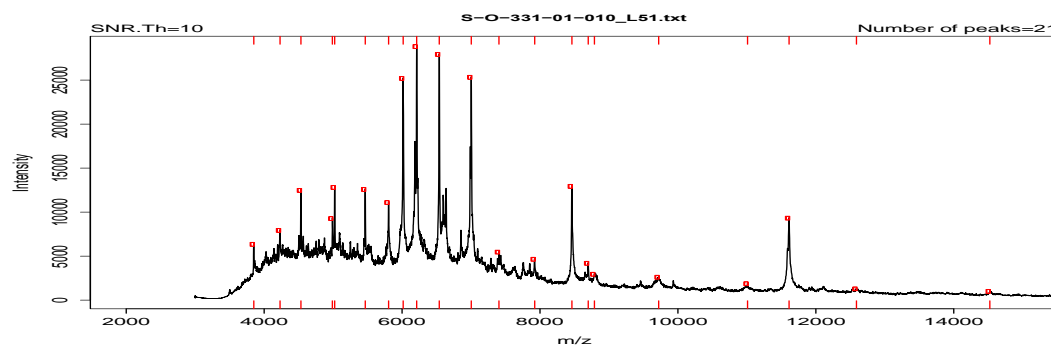


Figura 217. S-O-331 . *S. cerevisiae*

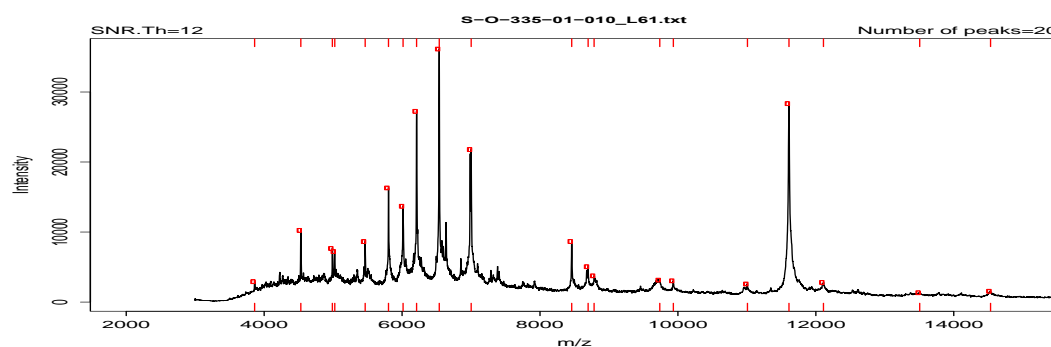


Figura 218. S-O-335 *S. cerevisiae*

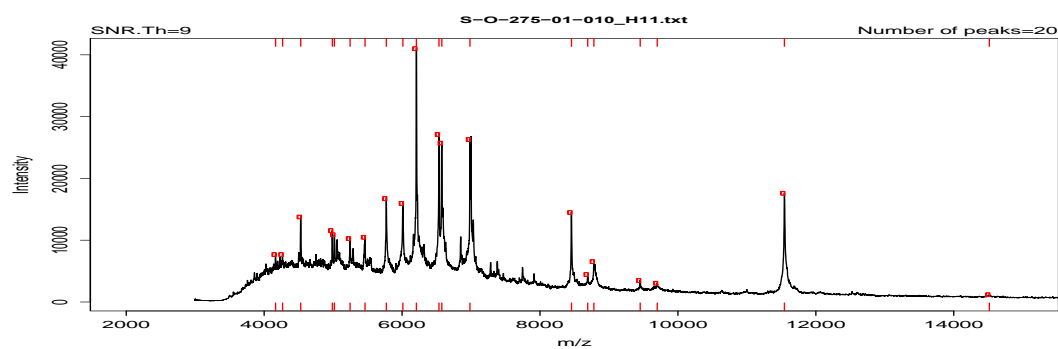


Figura 219. S-O-275 . *S. cerevisiae*

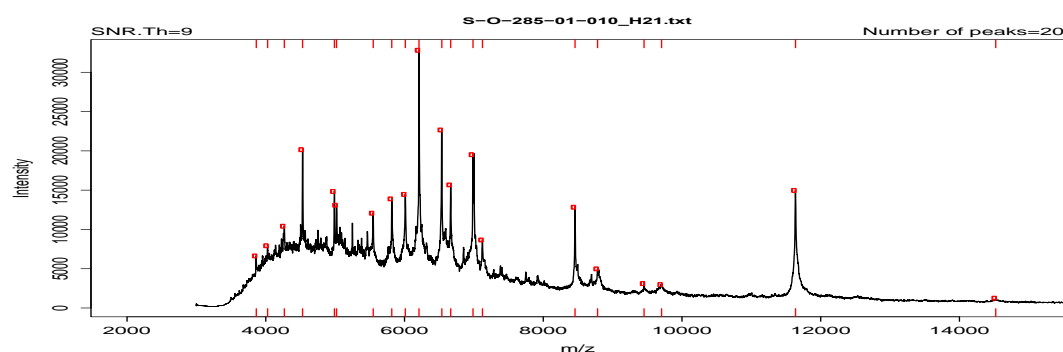


Figura 220. S-O-285 *S. cerevisiae*

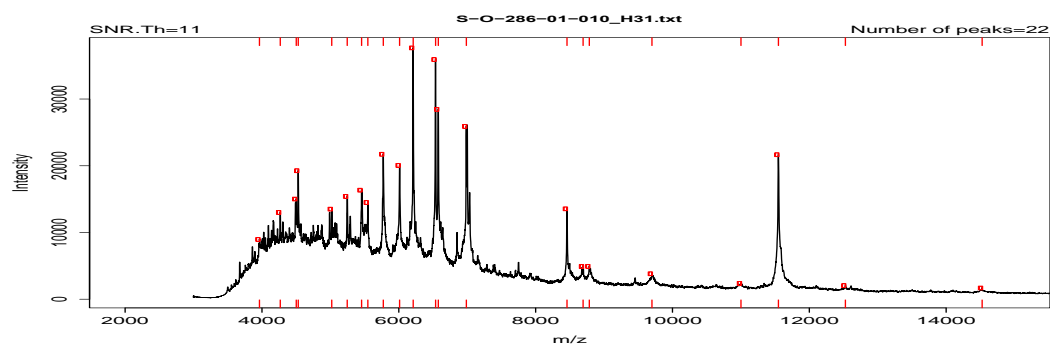


Figura 221. S-O-286 . *S. cerevisiae*

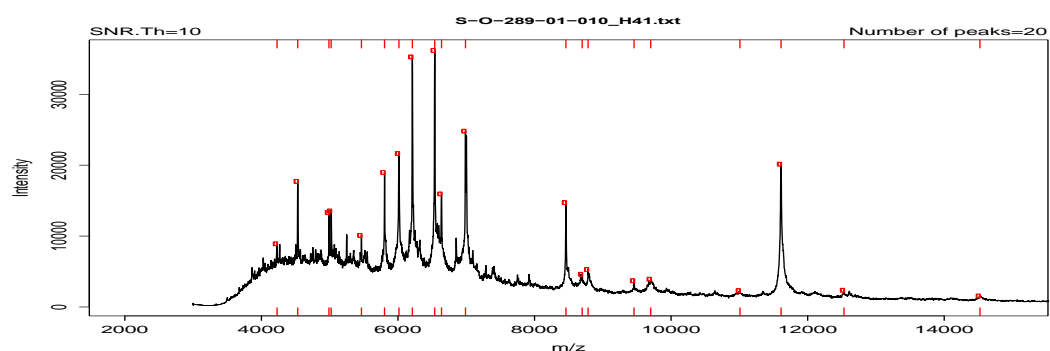


Figura 222. S-O-289. *S.cerevisiae*.

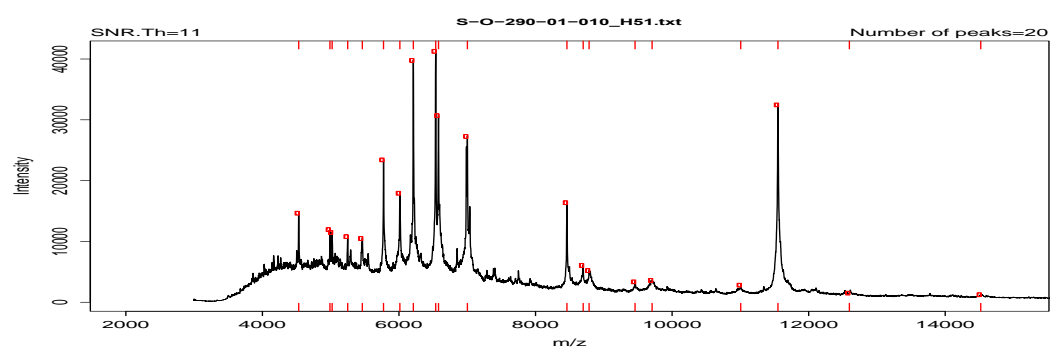


Figura 223. S-O-290 . *S. cerevisiae*



# Anexo II

---

Espectros de masas de cepas  
vínicas de especies de géneros  
*no-Saccharomyces*





## ANEXO II: Espectros de masas de cepas vínicas de especies de géneros no-Saccharomyces

Especie *Aureobasidium pullulans*

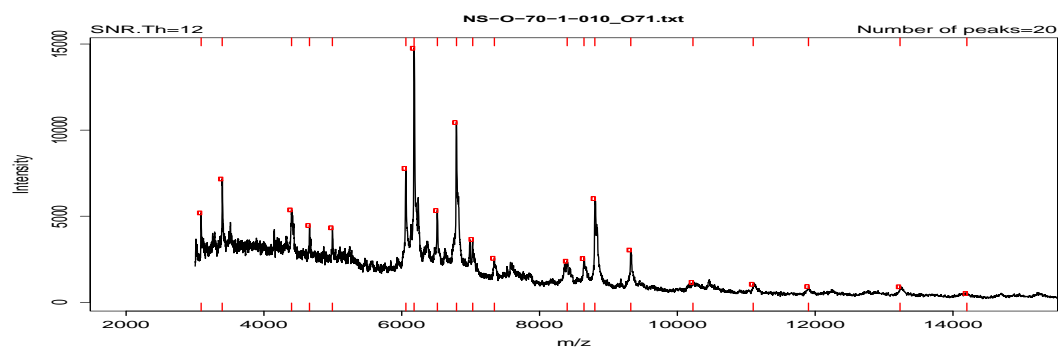


Figura 224. NS-O-70. *Aureobasidium pullulans*

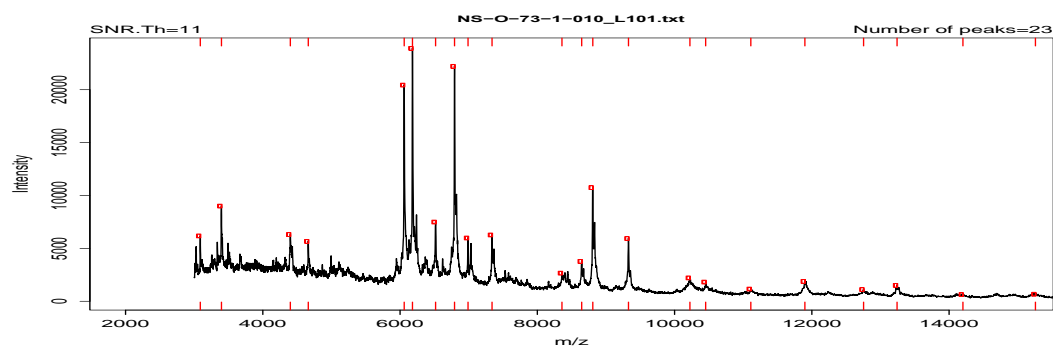


Figura 225. NS-O-73. *Aureobasidium pullulans*

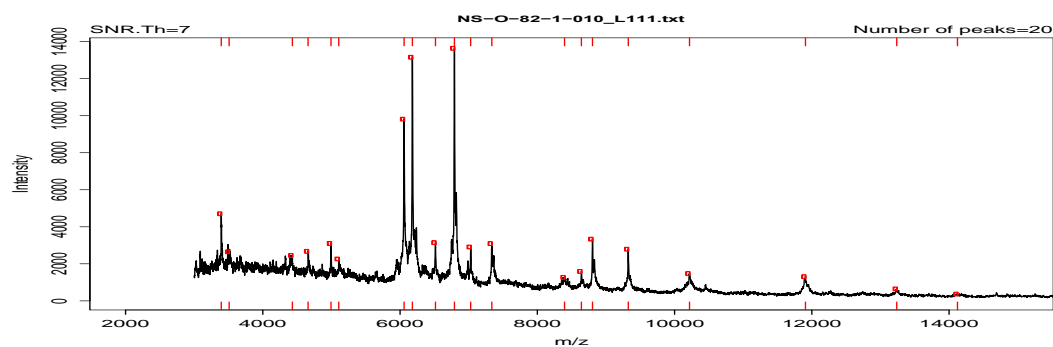


Figura 226. NS-O-82. *Aureobasidium pullulans*

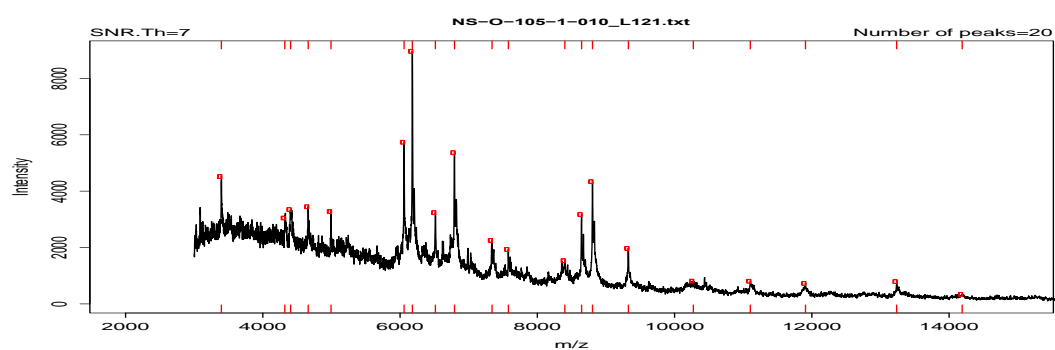


Figura 227. NS-O-105. *Aureobasidium pullulans*

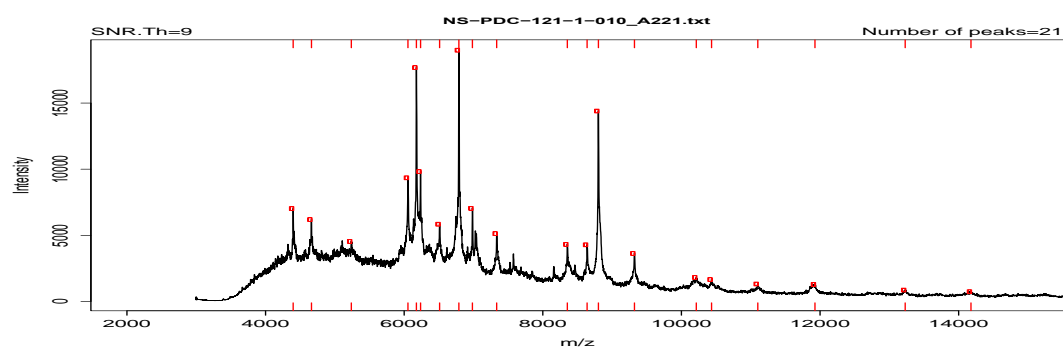


Figura 228. NS-PDC-121 *Aureobasidium pullulans*

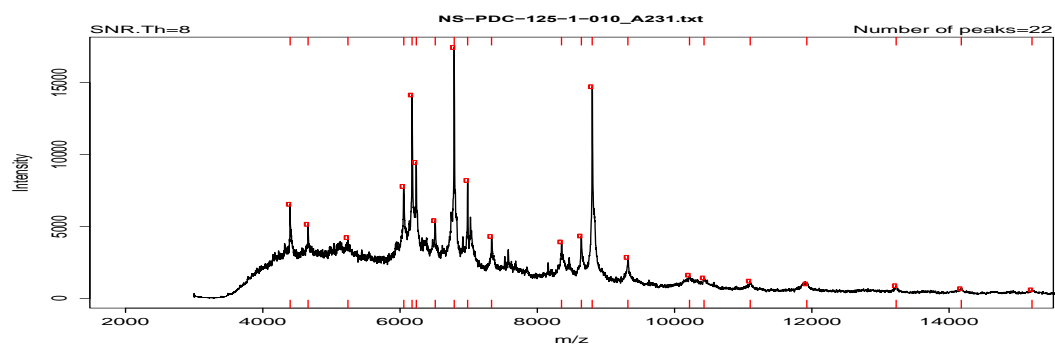


Figura 229. NS-PDC-125 *Aureobasidium pullulans*

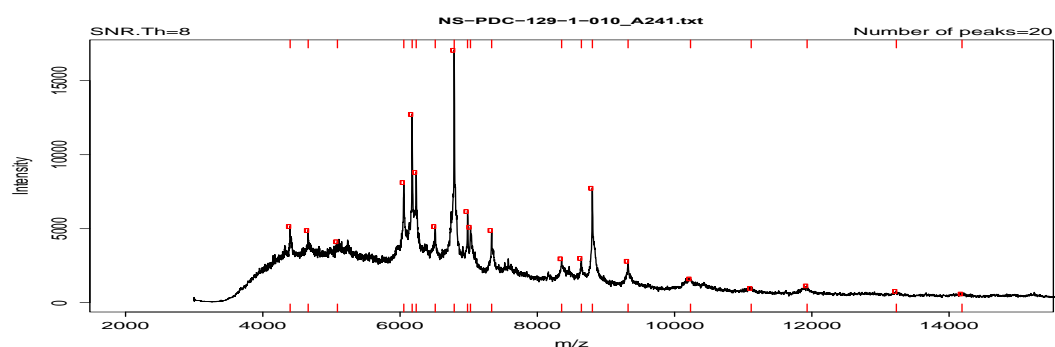


Figura 230. NS-PDC-129 *Aureobasidium pullulans*

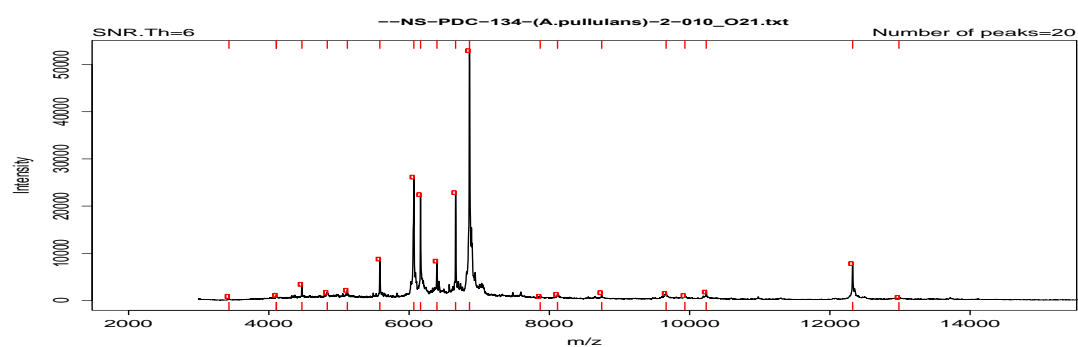


Figura 231. NS-PDC-134 *Aureobasidium pullulans*

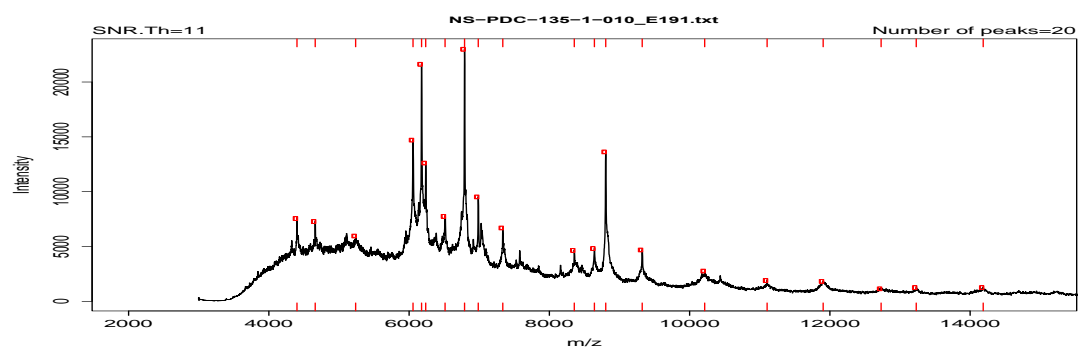


Figura 232. NS-PDC-135 *Aureobasidium pullulans*

Especie *Cryptococcus amylolentus*

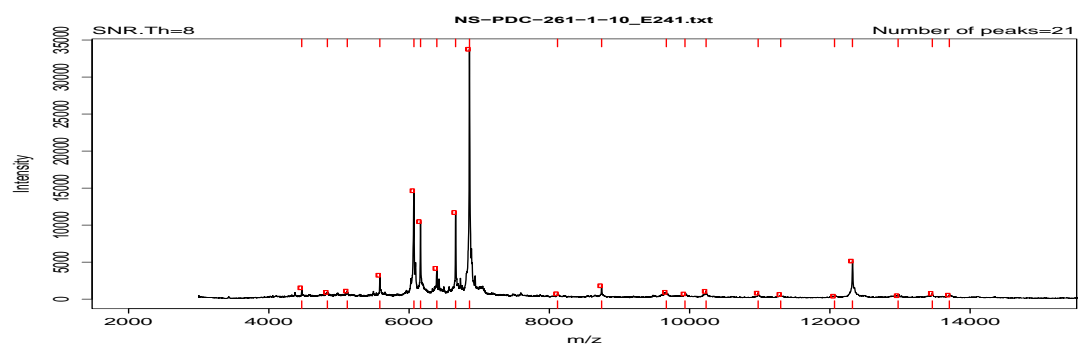


Figura 233. NS-PDC-261 *Cryptococcus amylolentus*

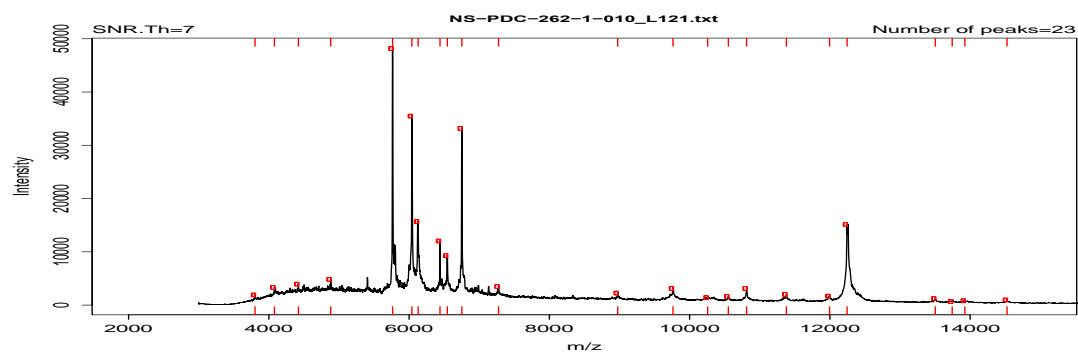


Figura 234. NS-PDC-262 *Cryptococcus amylolentus*

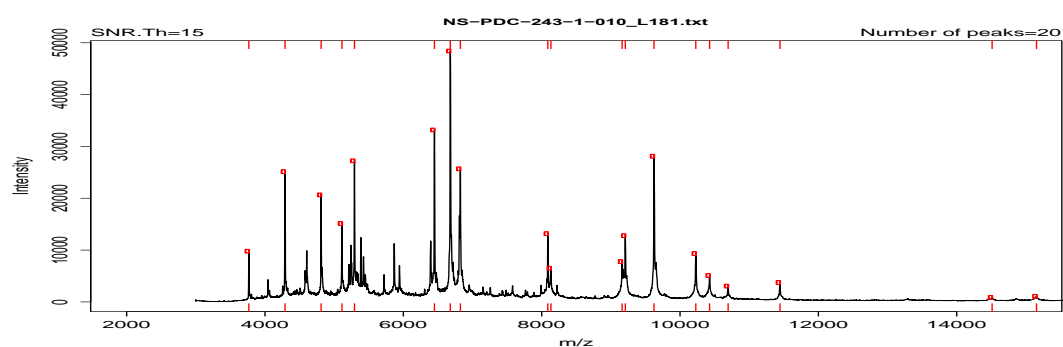


Figura 235. NS-PDC-243 *Cryptococcus amyloletus*

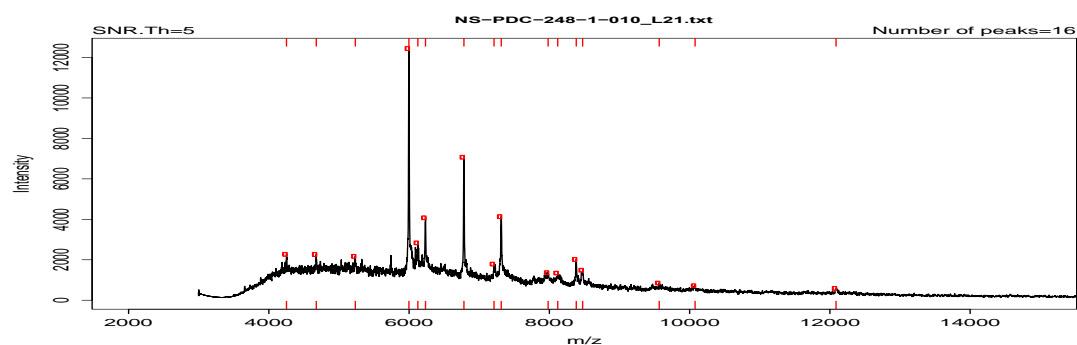


Figura 236. NS-PDC.248 *Cryptococcus amyloletus*

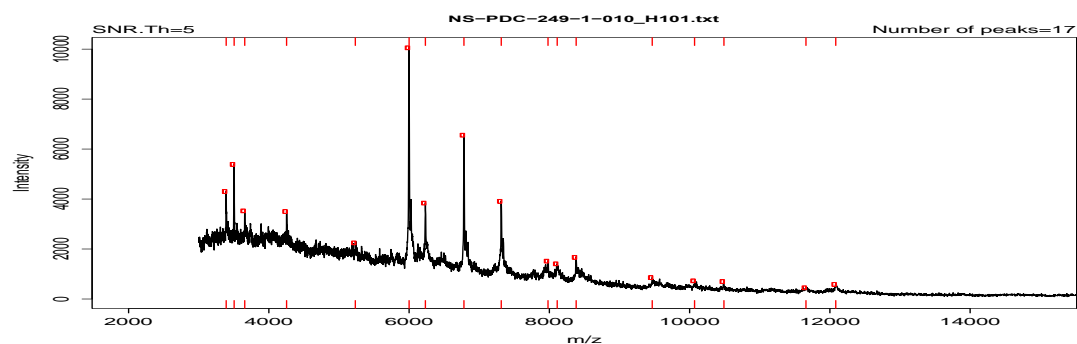


Figura 237. NS-PDC-249 *Cryptococcus amyloletus*

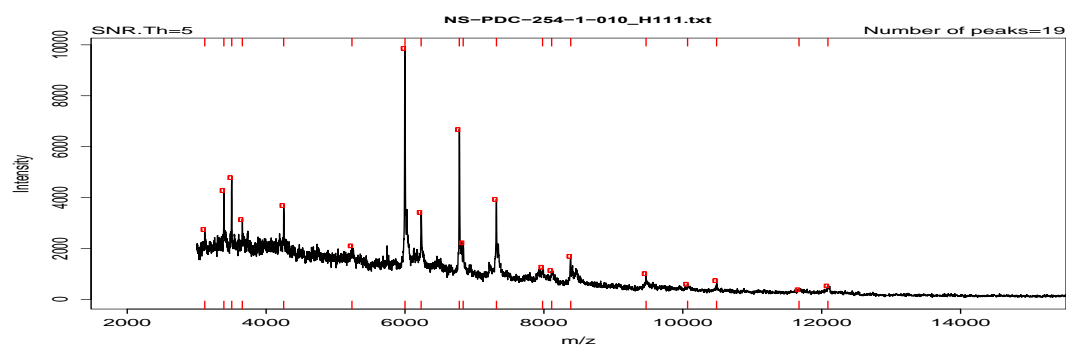


Figura 238. NS-PDC-254 *Cryptococcus amyloletus*

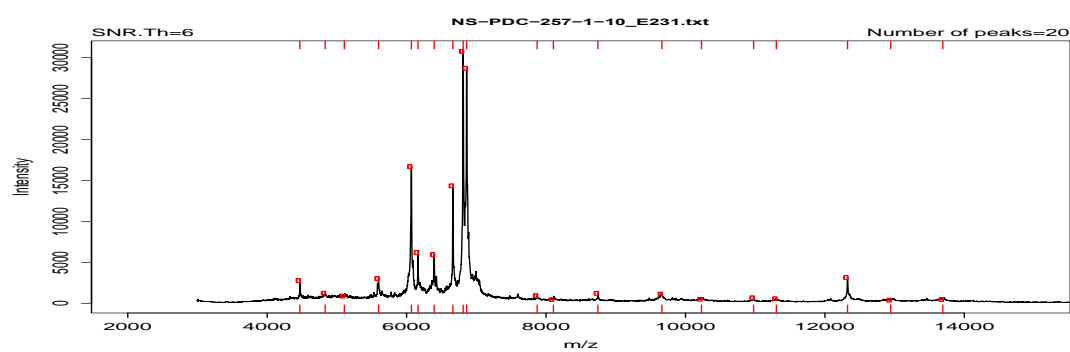


Figura 239. NS-PDC-257 *Cryptococcus amyloletus*

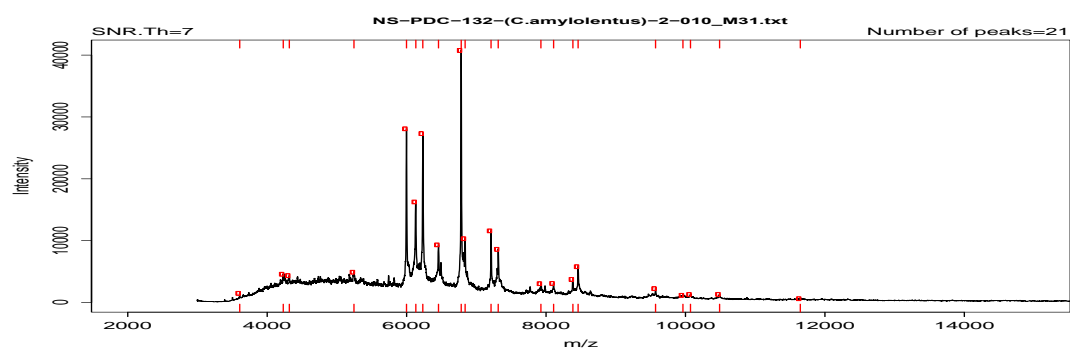
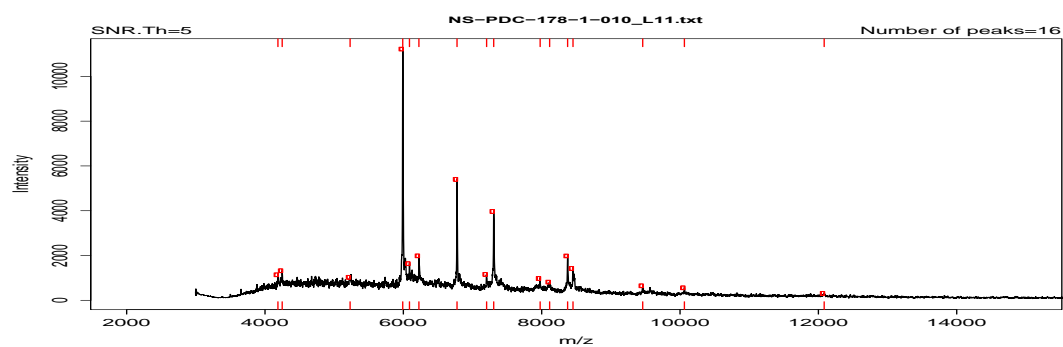


Figura 240. NS-PDC-132 *Cryptococcus amyloletus*



Especie *Hanseniaspora opuntiae*

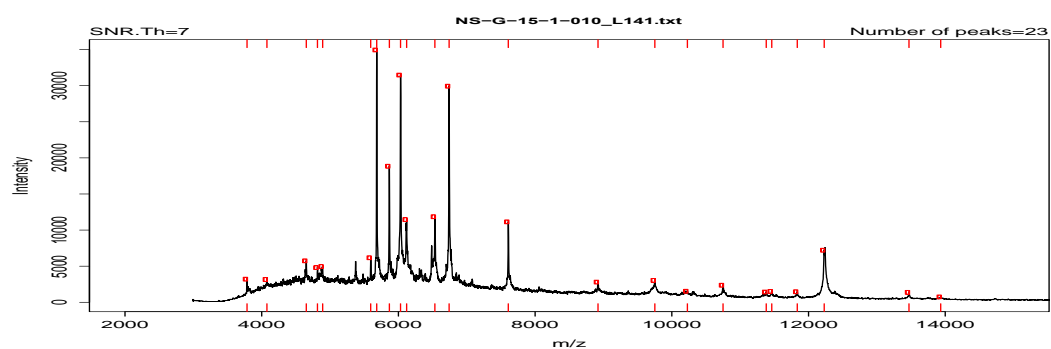


Figura 241. NS-G-15 *Hanseniaspora opuntiae*

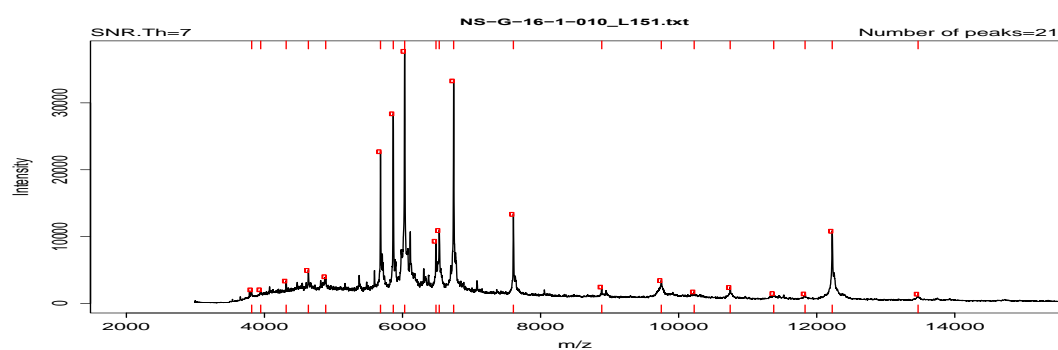


Figura 242. NS-G-16 *Hanseniaspora opuntiae*

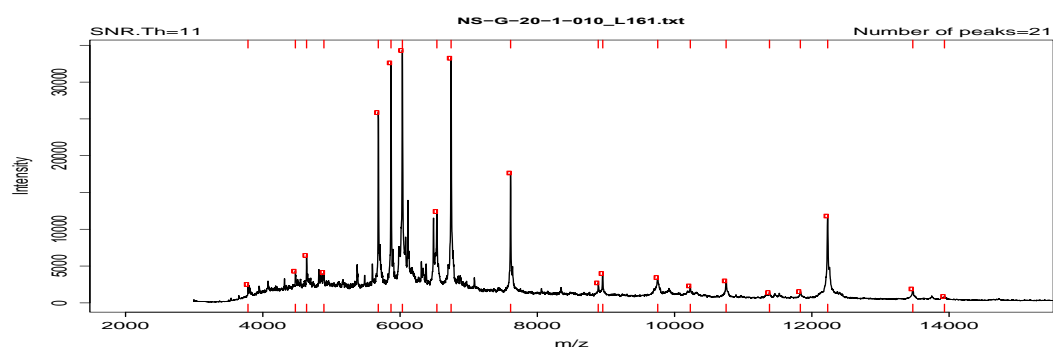


Figura 243. NS-G-20 *Hanseniaspora opuntiae*

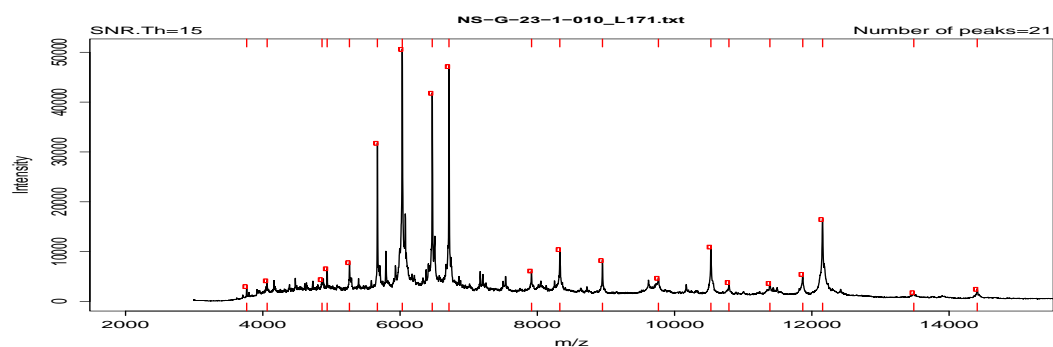


Figura 244. NS-G-23 *Hanseniaspora opuntiae*

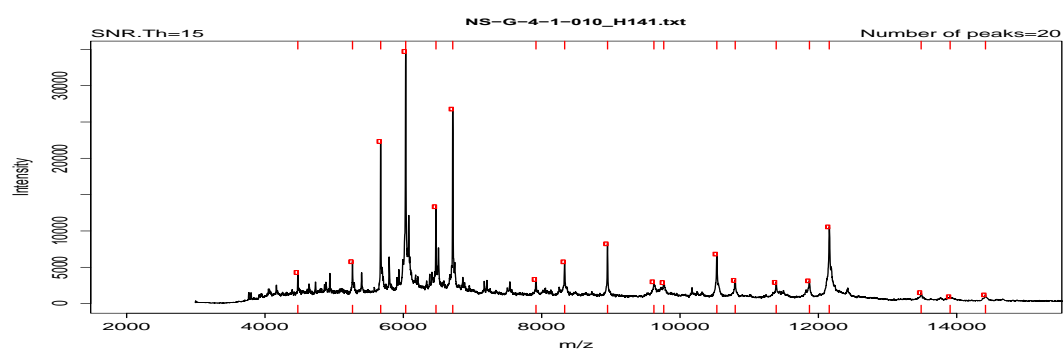


Figura 245. NS-G-4 *Hanseniaspora opuntiae*

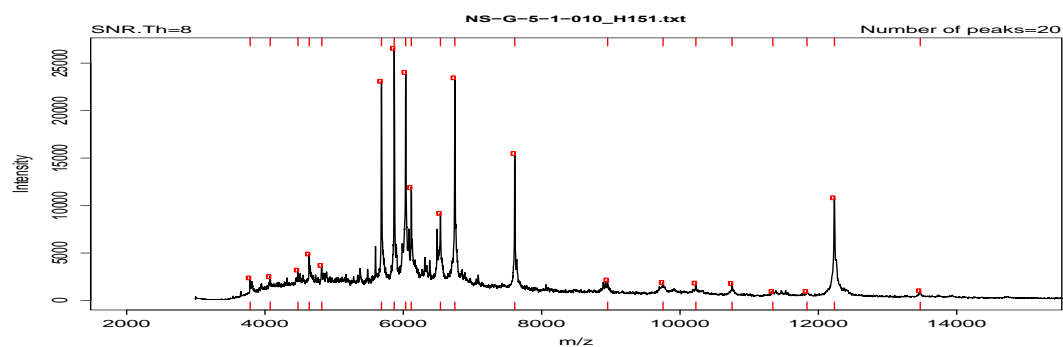


Figura 246. NS-G-5 *Hanseniaspora opuntiae*

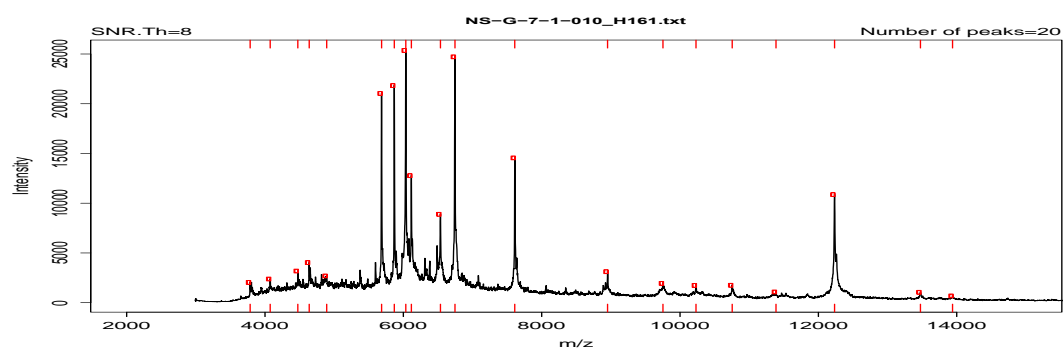


Figura 247. NS-G-7 *Hanseniaspora opuntiae*

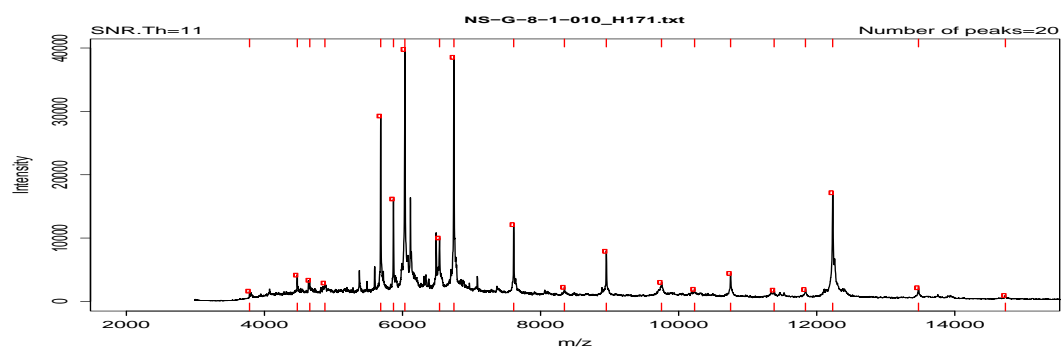


Figura 248. NS-G-8 *Hanseniaspora opuntiae*

### Especie *Hanseniaspora osmophila*

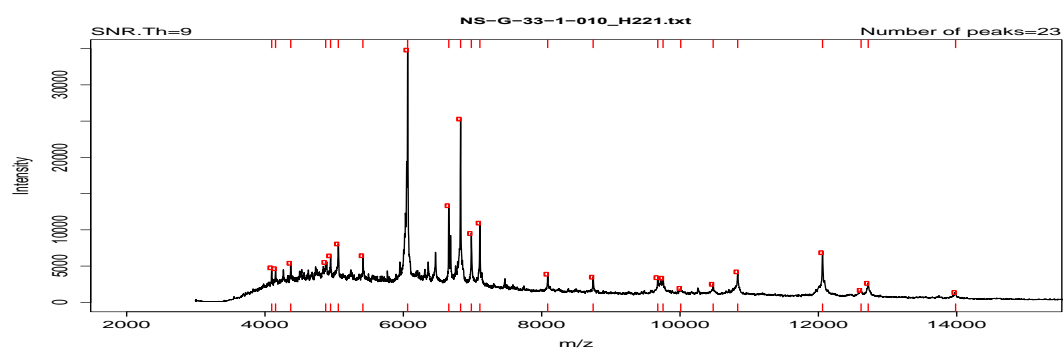


Figura 249. NS-G-33 *Hanseniaspora osmophila*

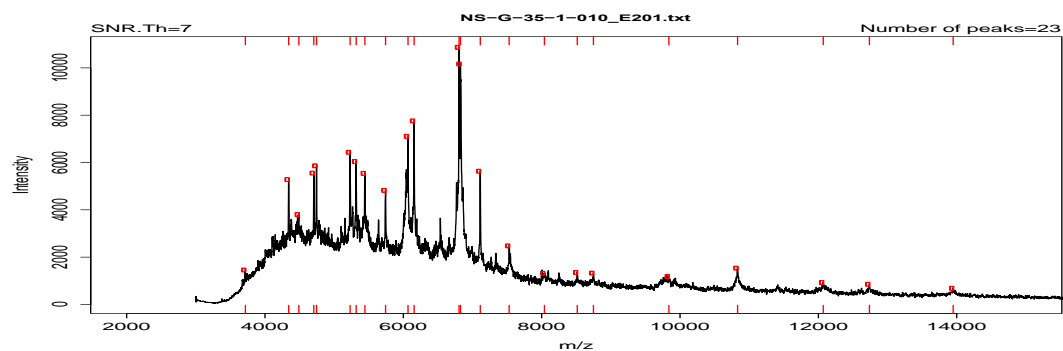


Figura 250. NS-G-35 *Hanseniaspora osmophila*

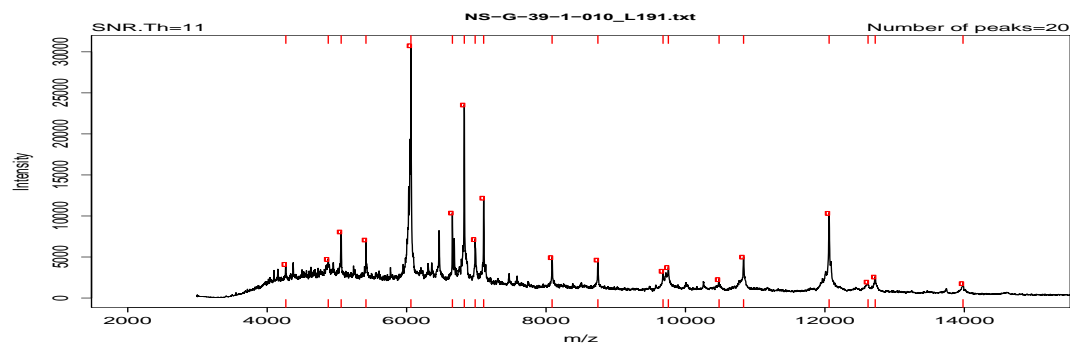


Figura 251. NS-G-39 *Hanseniaspora osmophila*

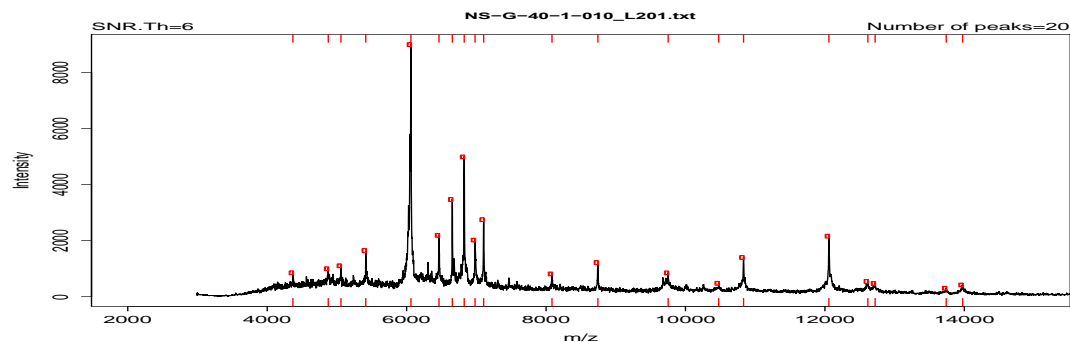


Figura 252. NS-G-40 *Hanseniaspora osmophila*

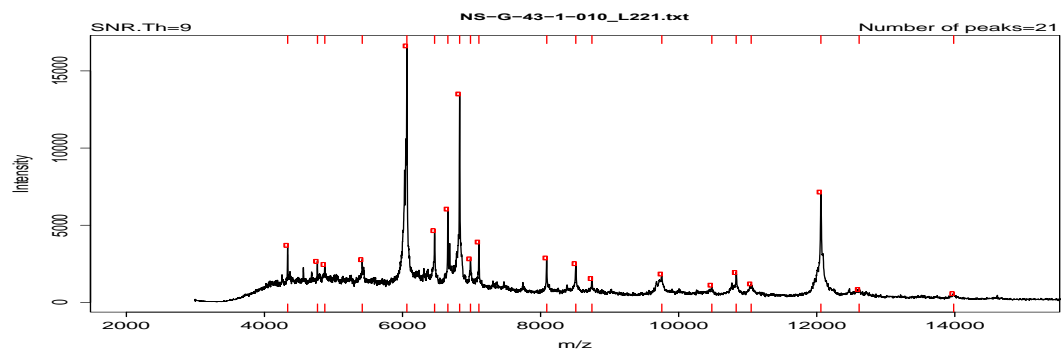


Figura 253. NS-G-43 *Hanseniaspora osmophila*



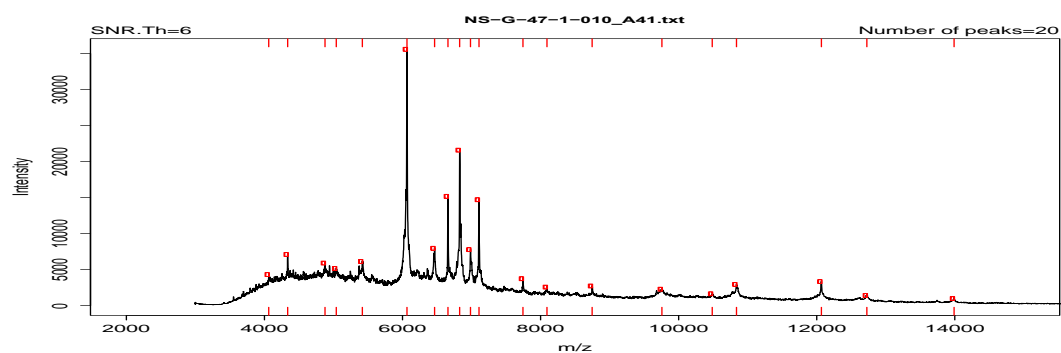


Figura 254. NS-G-47 *Hanseniaspora osmophila*

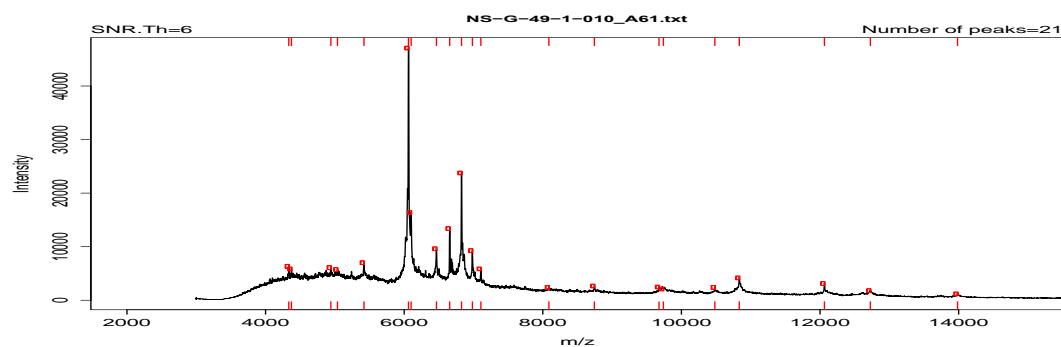


Figura 255. NS-G-49 *Hanseniaspora osmophila*

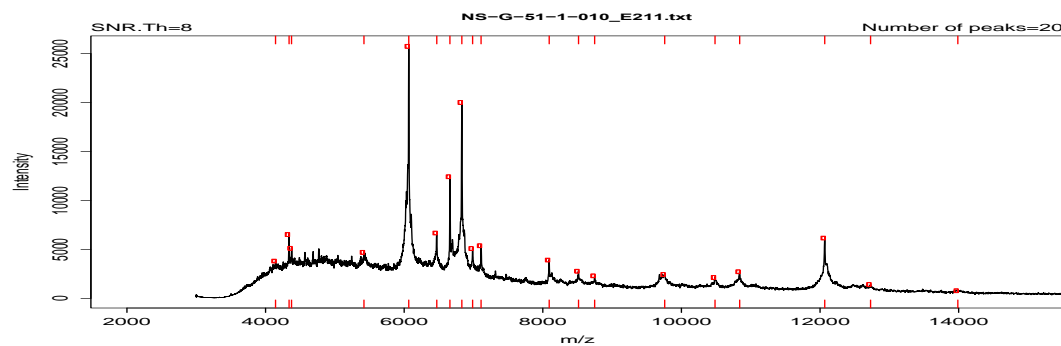


Figura 256. NS-G-51 *Hanseniaspora osmophila*

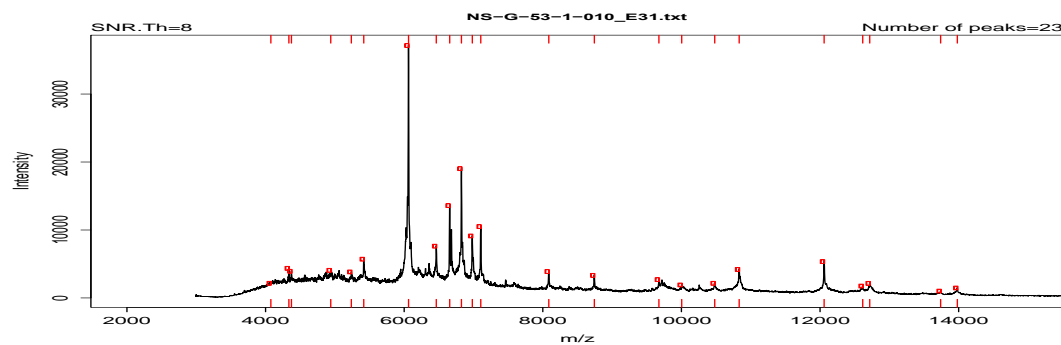


Figura 257. NS-G-53 *Hanseniaspora osmophila*

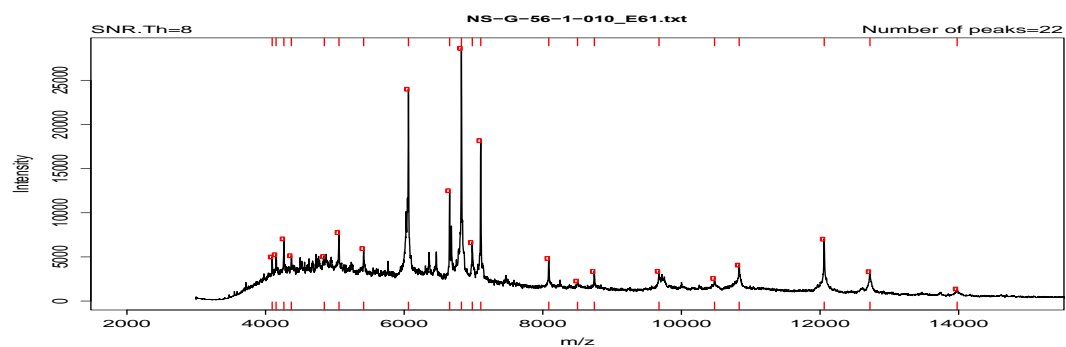


Figura 258. NS-G-56 *Hanseniaspora osmophila*

Especie *Hanseniaspora uvarum*

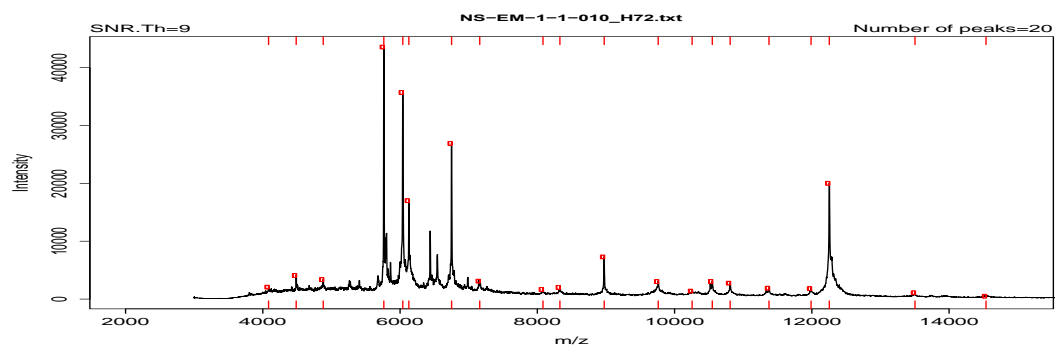


Figura 259. NS-EM-CV-1. *Hanseniaspora uvarum*

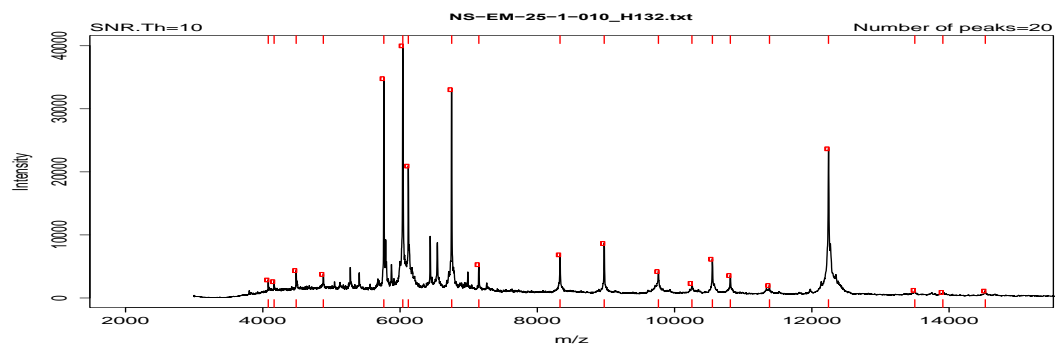


Figura 260. NS-EM-CV-25 *Hanseniaspora uvarum*

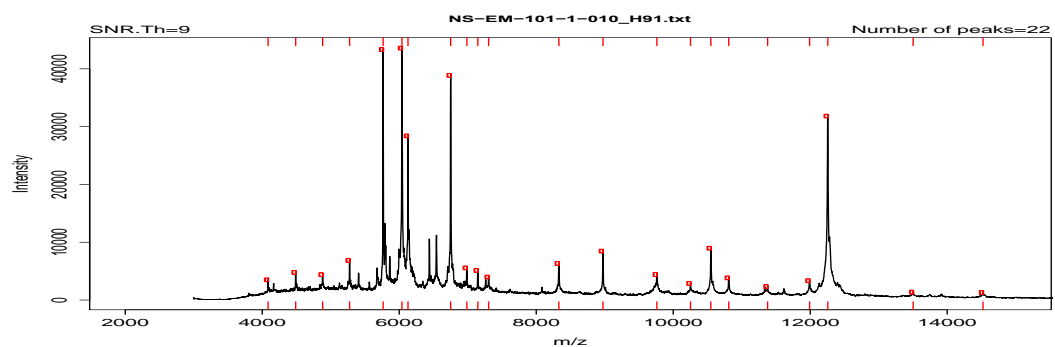


Figura 261. NS-EM-VR-101 *Hanseniaspora uvarum*

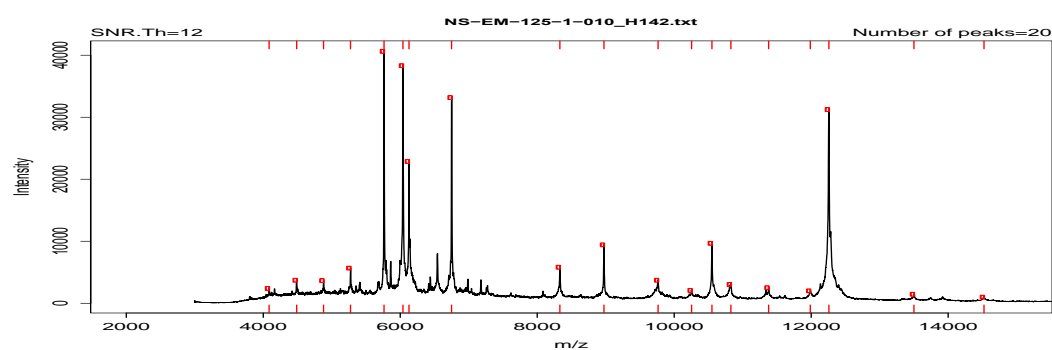


Figura 262. NS-EM-VR-125 *Hanseniaspora uvarum*

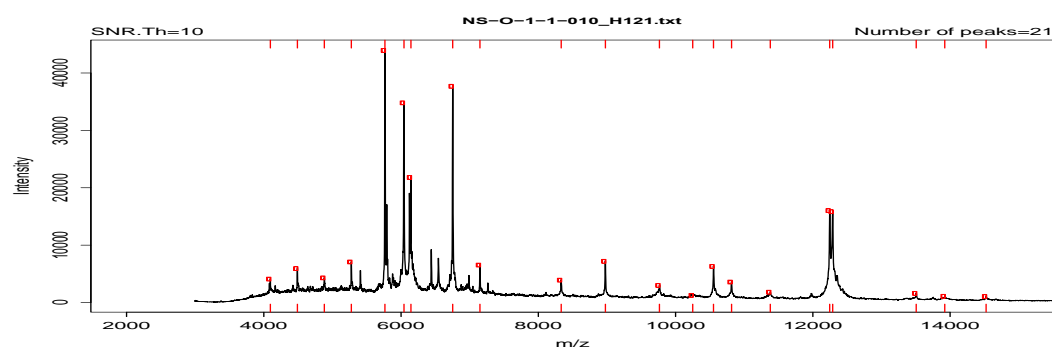


Figura 263. NS-O-1. *Hanseniaspora uvarum*

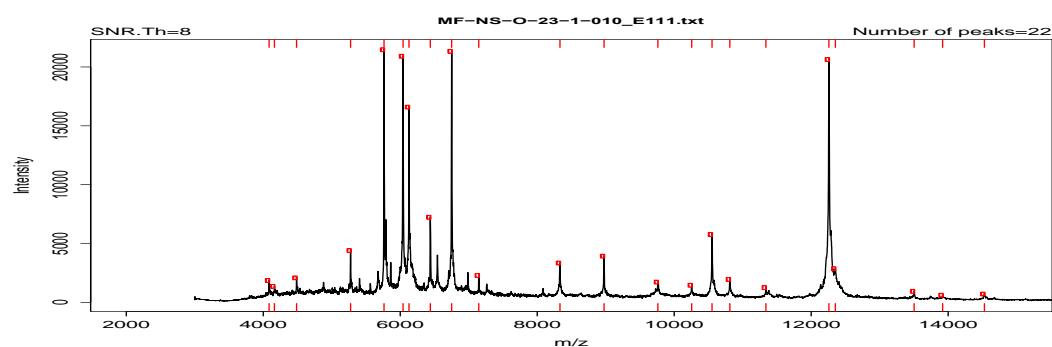


Figura 264. NS-O-23 *Hanseniaspora uvarum*

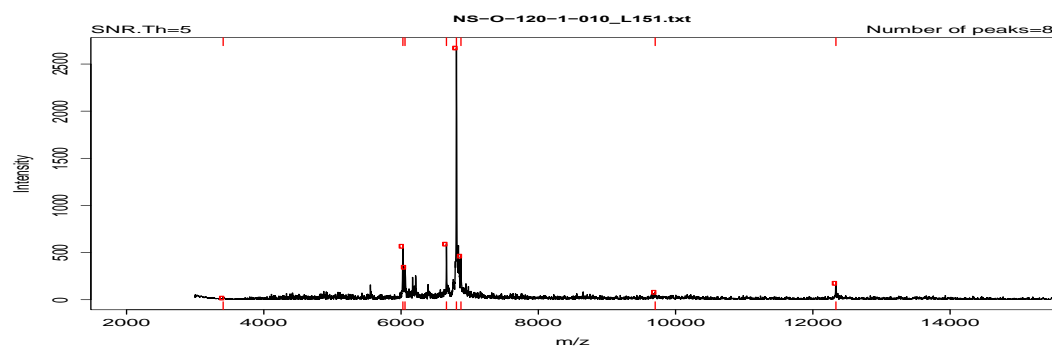


Figura 265. NS-O-120\*. *M. viticola* \*.

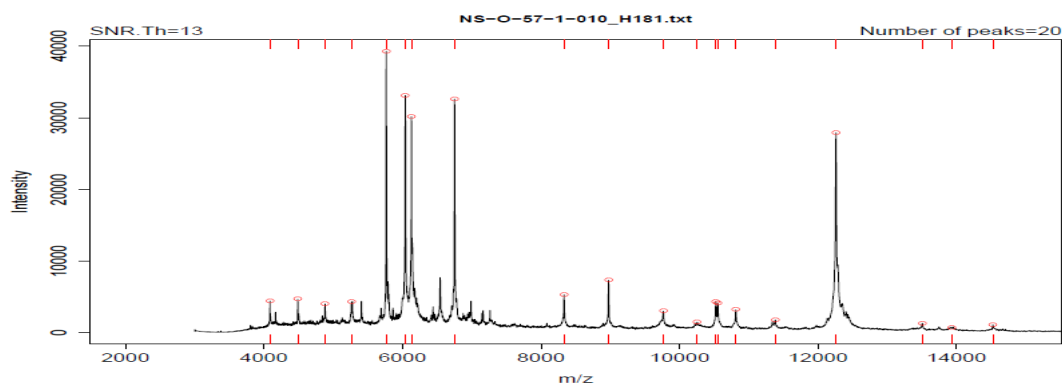


Figura 266. NS-O-57 *Hanseniaspora uvarum*

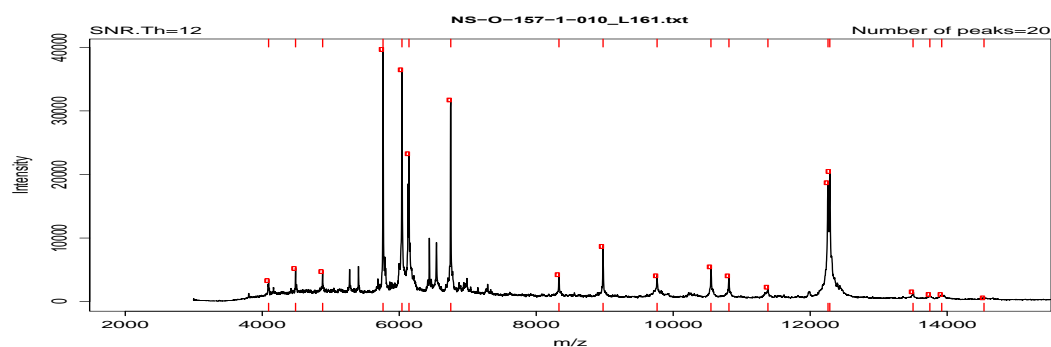


Figura 267. NS-O-157 *Hanseniaspora uvarum*

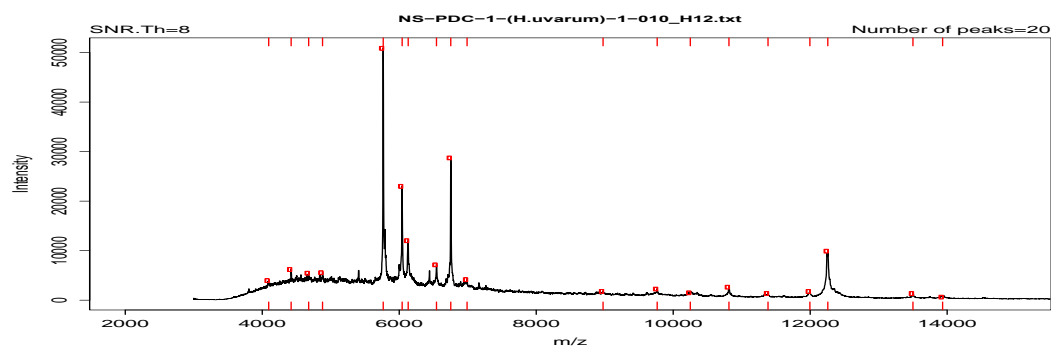


Figura 268. NS-PDC-1 *Hanseniaspora uvarum*

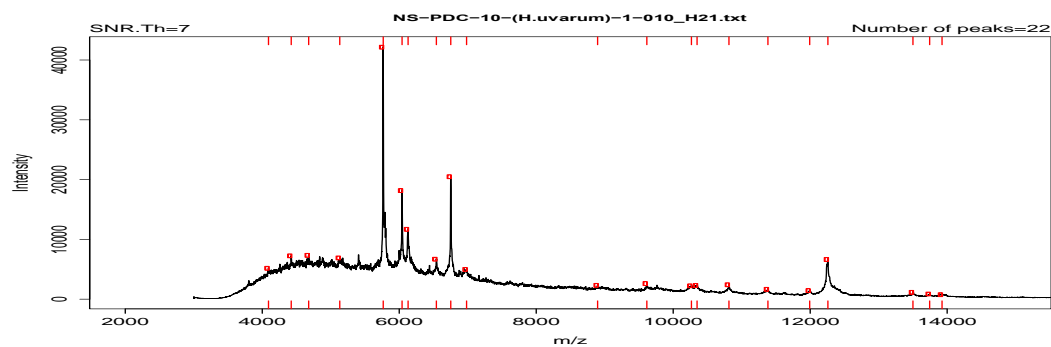


Figura 269. NS-PDC-10 *Hanseniaspora uvarum*

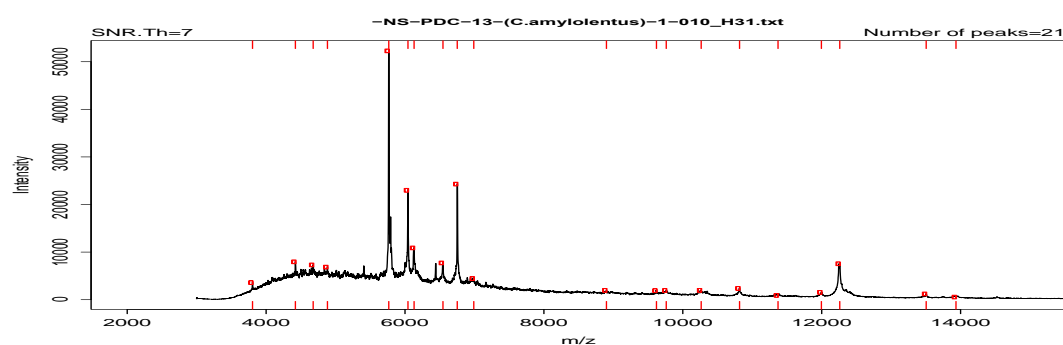


Figura 270. NS-PDC-13 *Hanseniaspora uvarum*

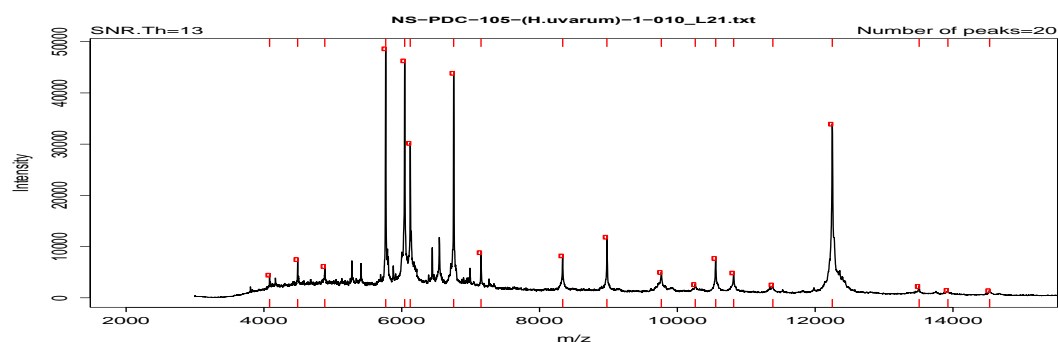


Figura 271. NS-PDC-105 *Hanseniaspora uvarum*

Especie *Kluyveromyces marxianus*

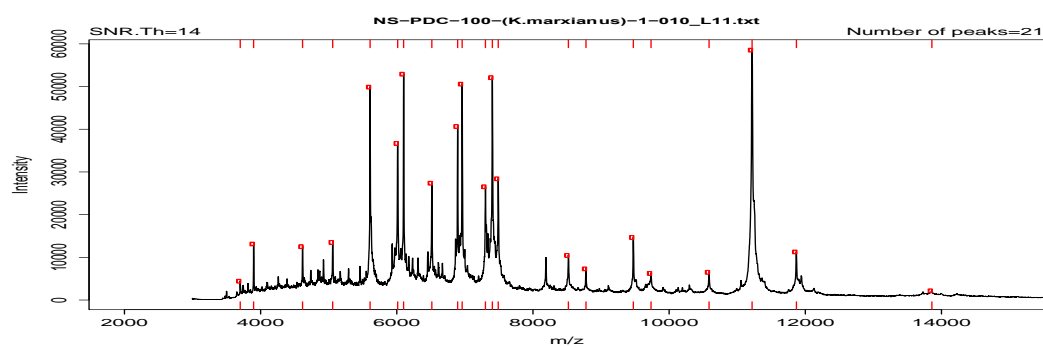


Figura 272. NS-PDC-100 *Kluyveromyces marxianus*

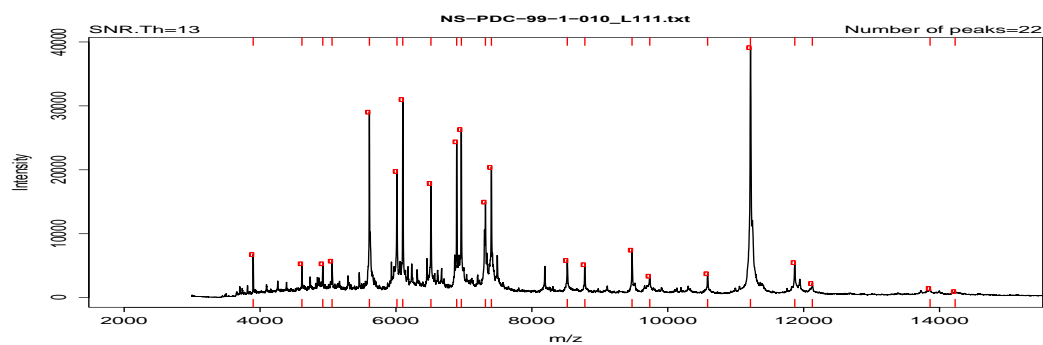


Figura 273. NS-PDC-99 *Kluyveromyces marxianus*

Especie *Lachancea thermotolerans*

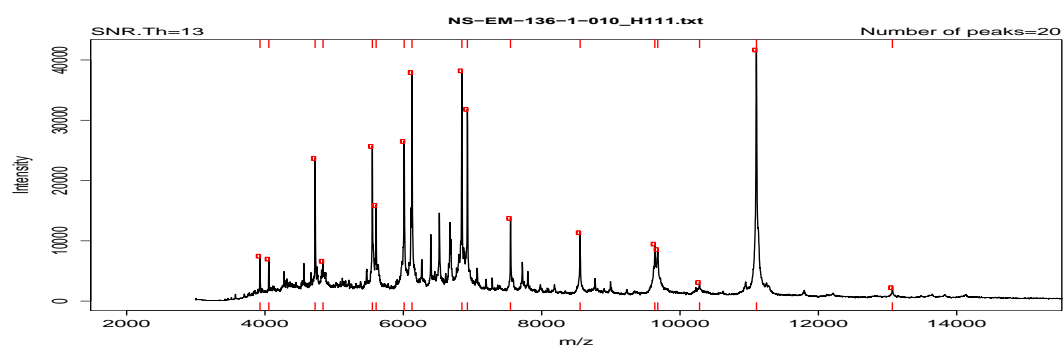


Figura 274. NS-EM-HO-136 *Lachancea thermotolerans*

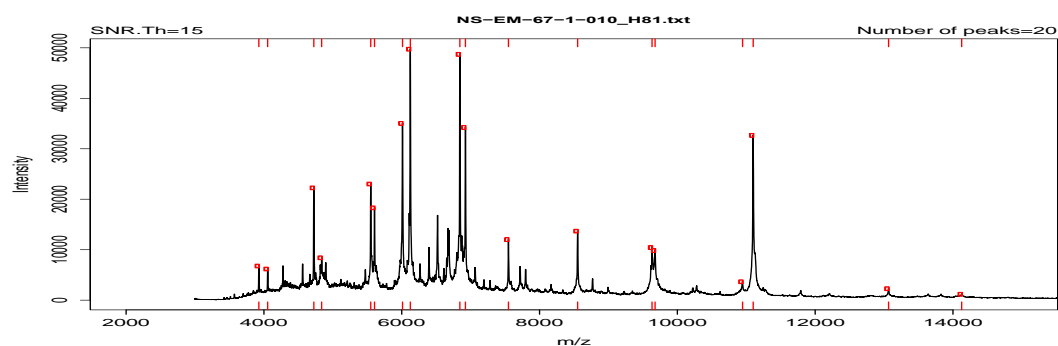


Figura 275. NS-EM-MA-67 *Lachancea thermotolerans*

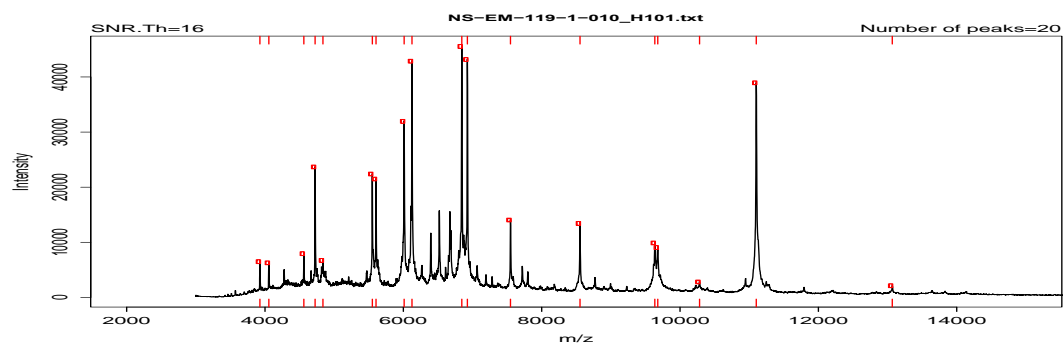


Figura 276. NS-EM-VR-119 *Lachancea thermotolerans*

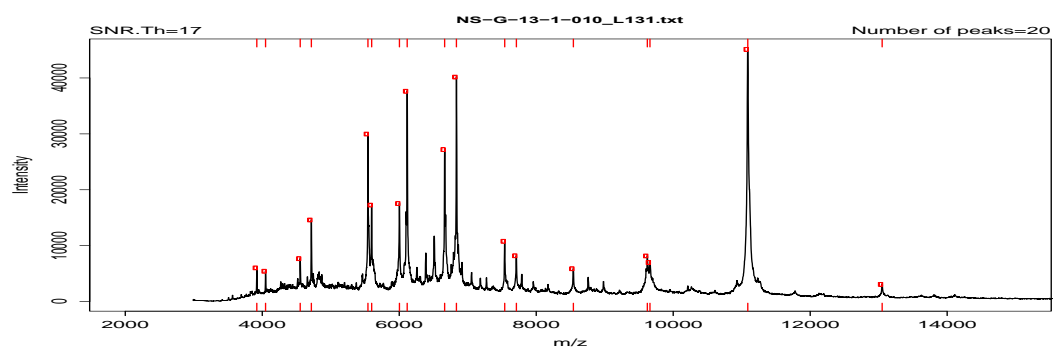


Figura 277. NS-G-13 *Lachancea thermotolerans*

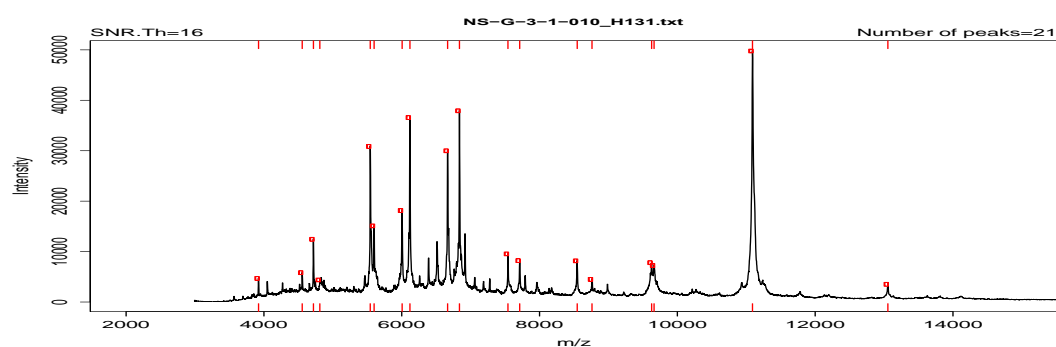


Figura 278. NS-G-3 *Lachancea thermotolerans*

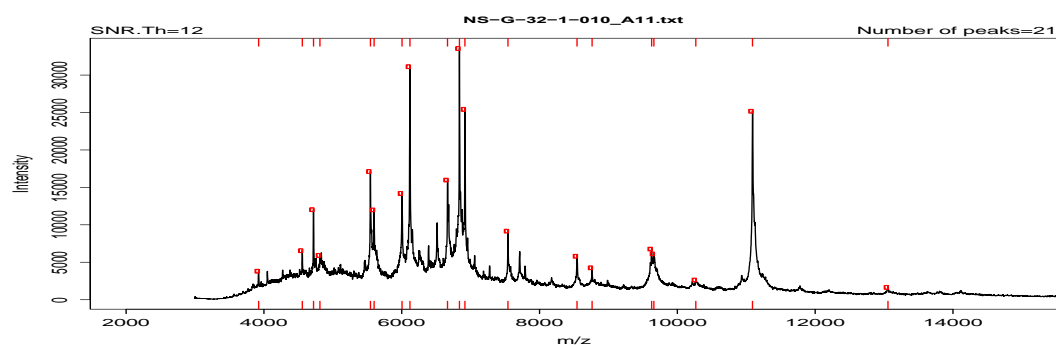


Figura 279. NS-G-32 *Lachancea thermotolerans*

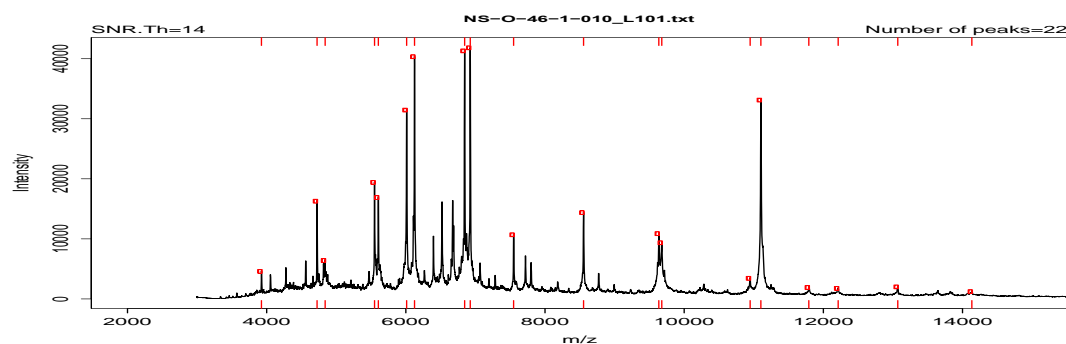


Figura 280. NS-O-46 *Lachancea thermotolerans*

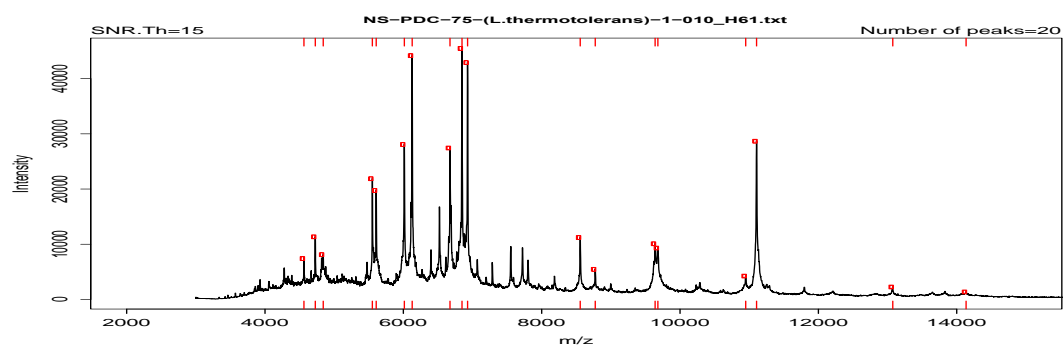


Figura 281. NS-PDC-75 *Lachancea thermotolerans*

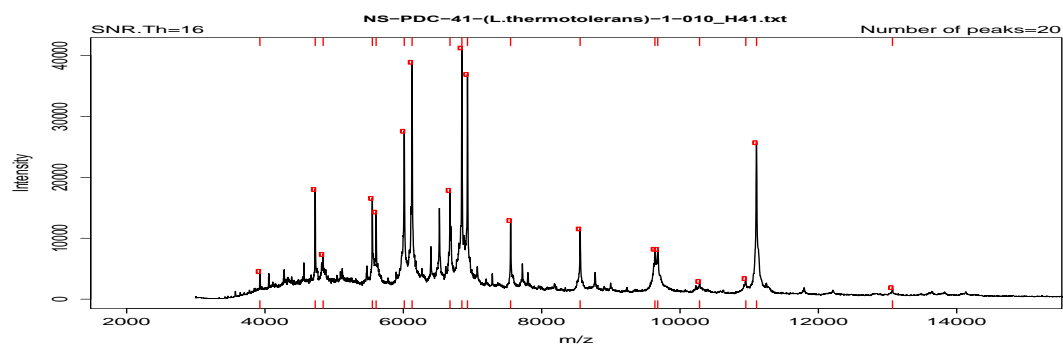


Figura 282. NS-PDC-41 *Lachancea thermotolerans*

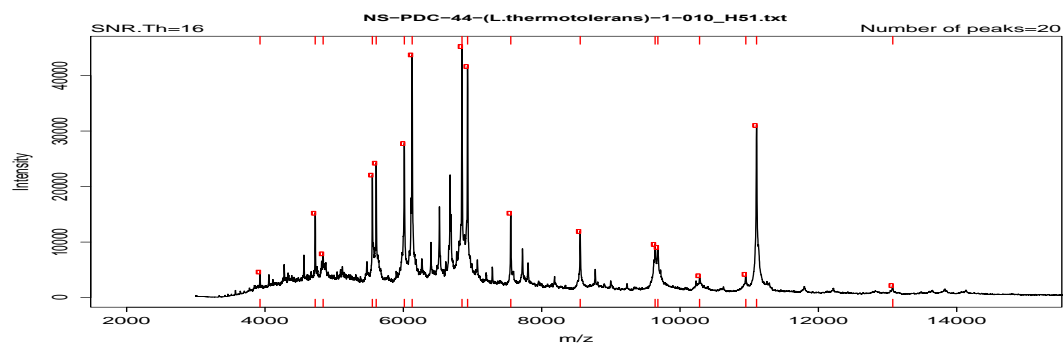


Figura 283. NS-PDC-44 *Lachancea thermotolerans*

### Especie *Metschnikowia fructicola*

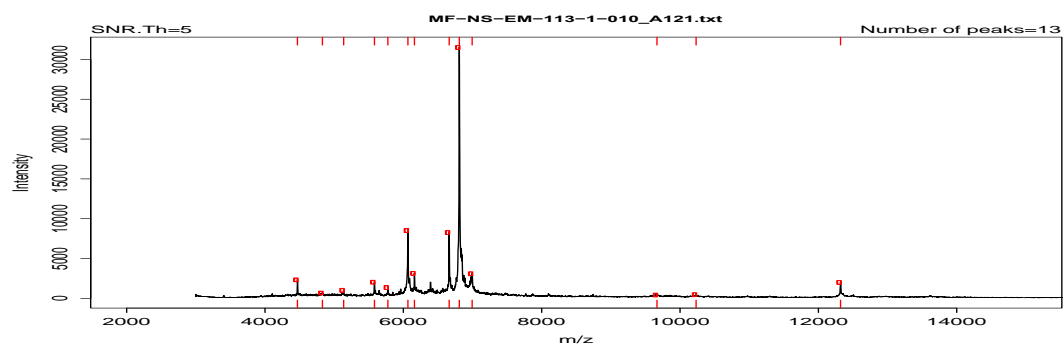


Figura 284. NS-EM-VR-113 *Metschnikowia fructicola*

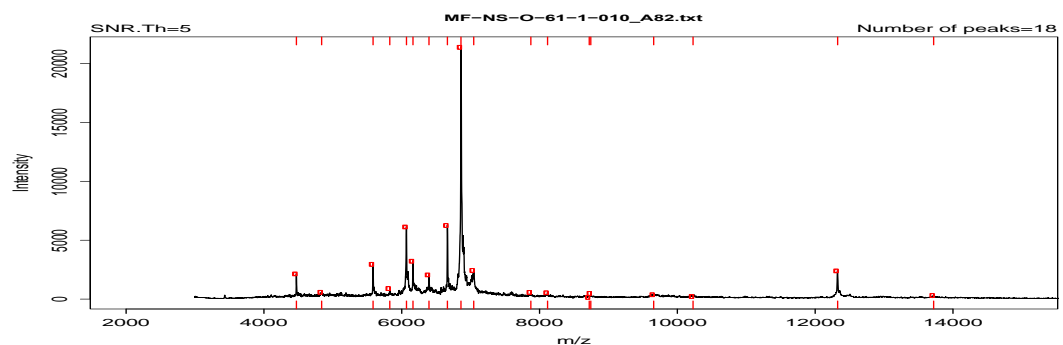


Figura 285. NS-O-61 *Metschnikowia fructicola*



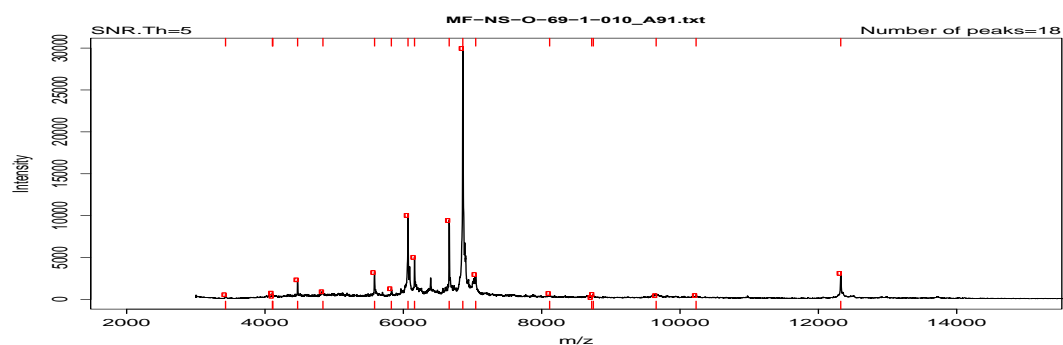


Figura 286. NS-O-69 *Metschnikowia fructicola*

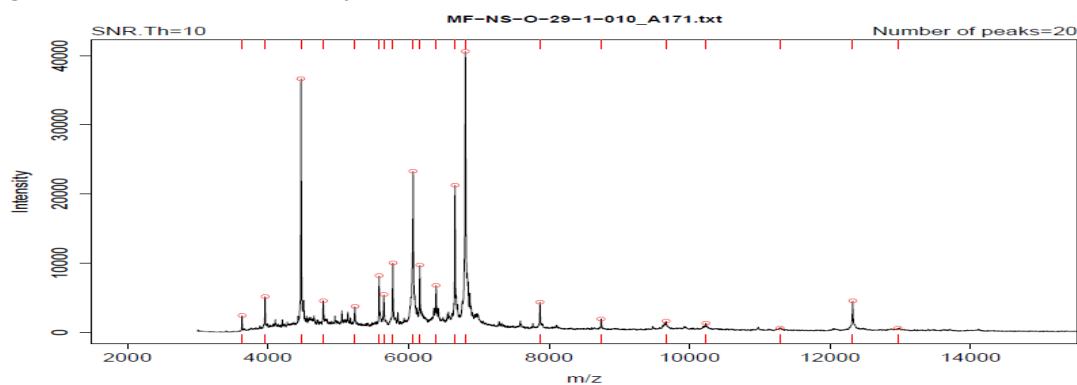


Figura 287. NS- O-29 *Metschnikowia fructicola*

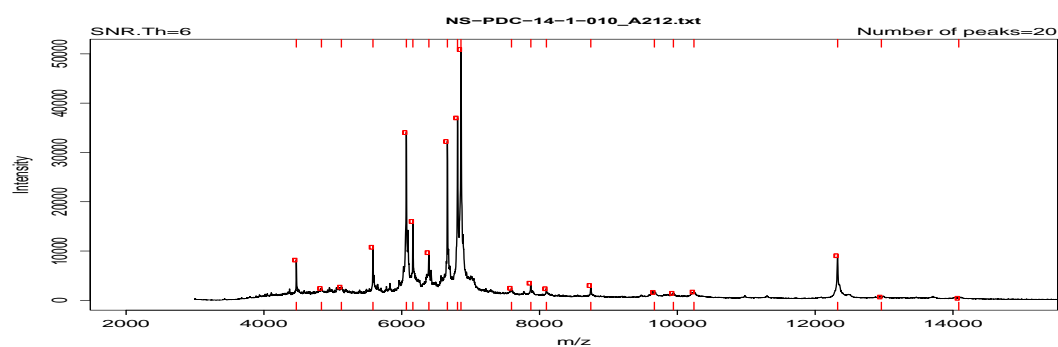


Figura 288. NS-PDC-14 *Metschnikowia fructicola*

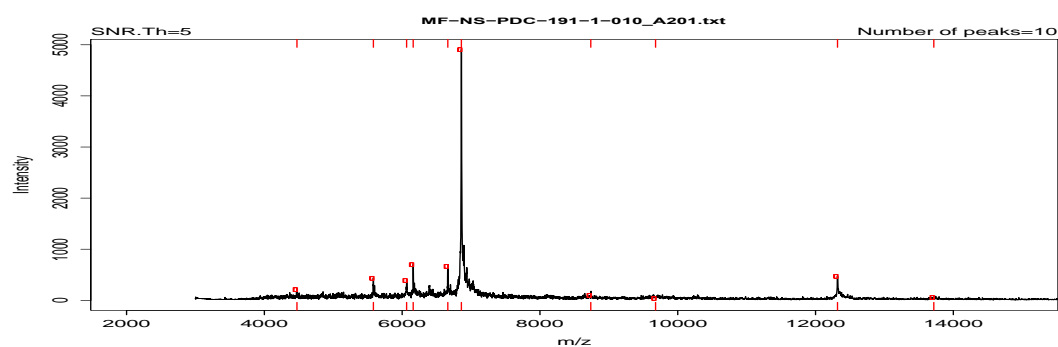


Figura 289. NS-PDC-191 *Metschnikowia fructicola*

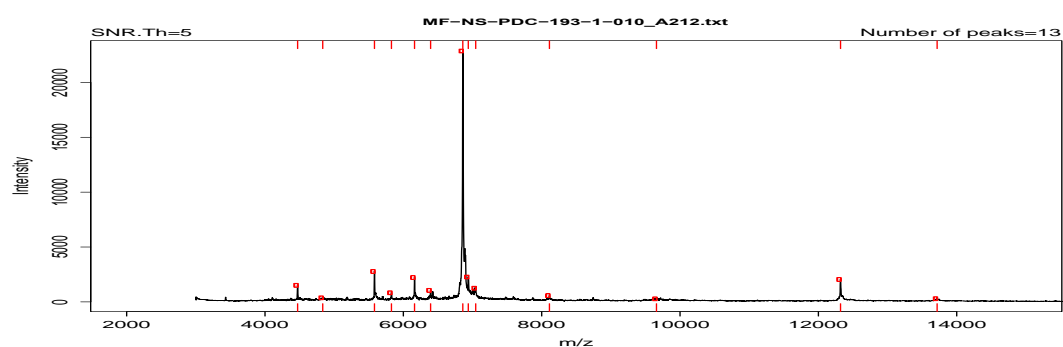


Figura 290. NS-PDC-193 *Metschnikowia fructicola*

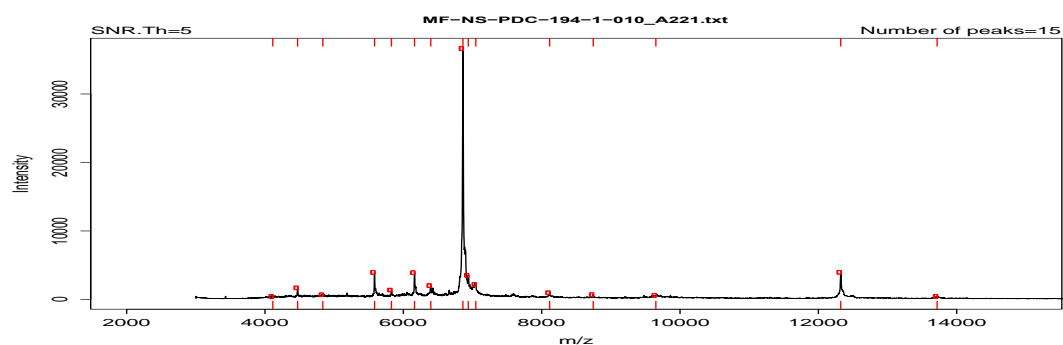


Figura 291. NS-PDC-194 *Metschnikowia fructicola*

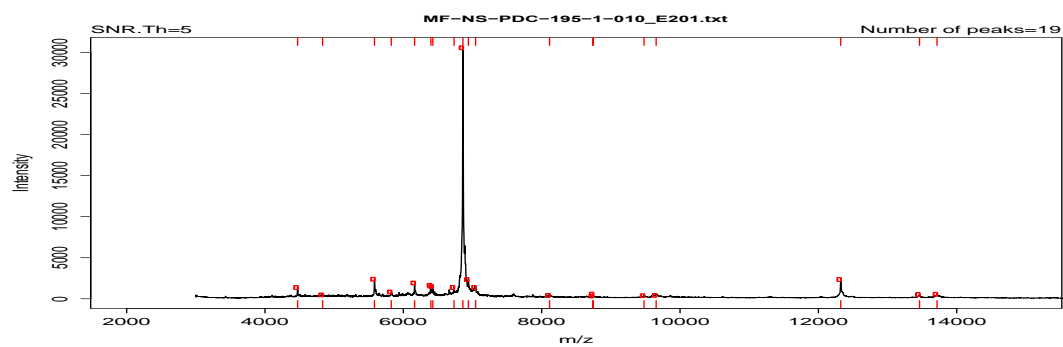


Figura 292. NS-PDC-195 *Metschnikowia fructicola*

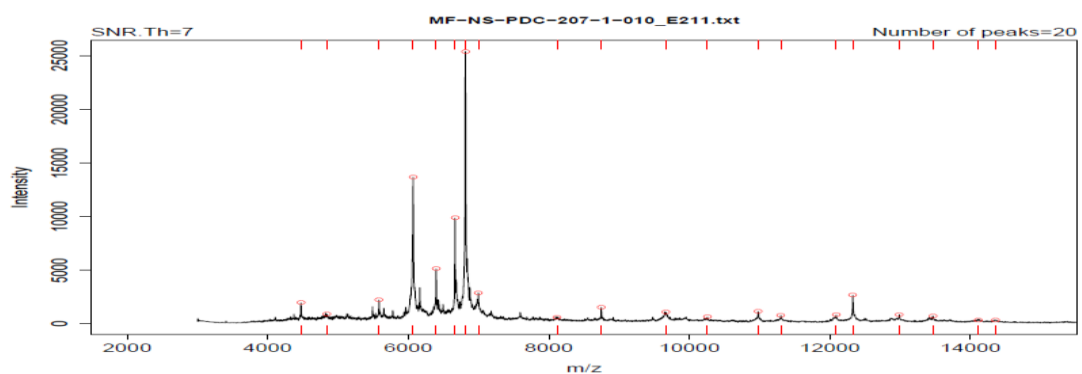


Figura 293. NS-PDC-207 *Metschnikowia fructicola*

Especie *Metschnikowia pulcherrima*

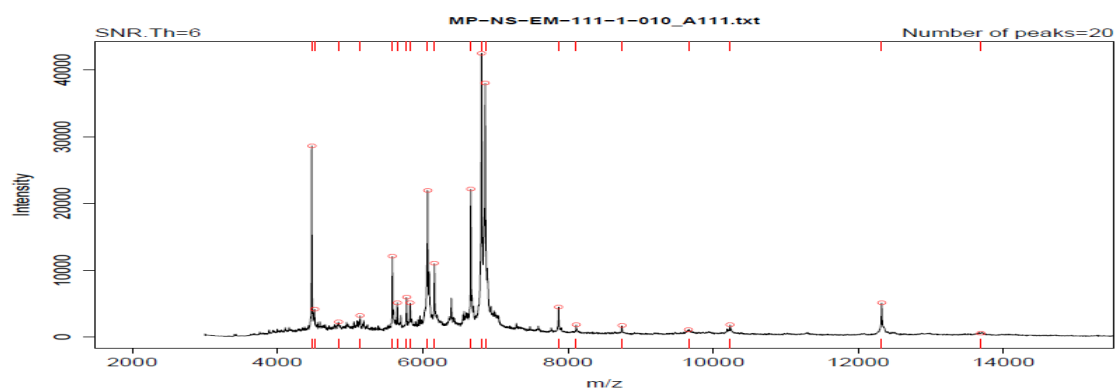


Figura 294. NS-EM-VR-111 *Metschnikowia pulcherrima*

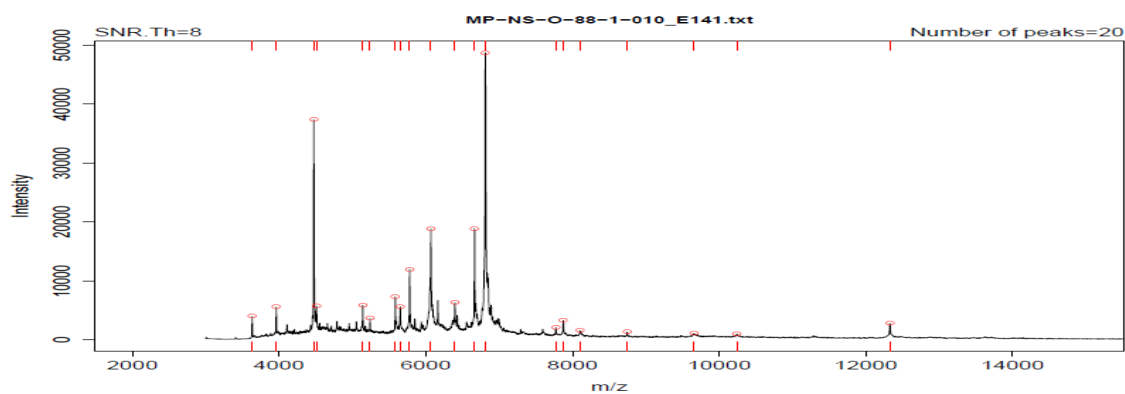


Figura 295. NS-0-88 *Metschnikowia pulcherrima*

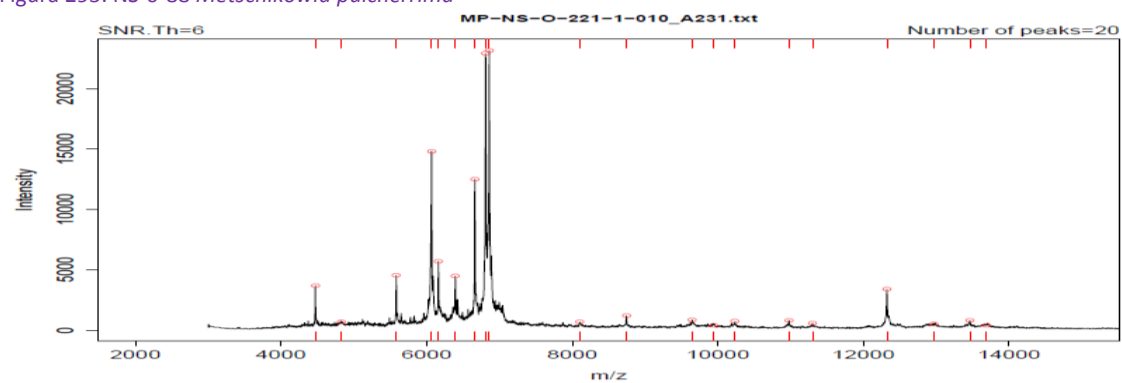


Figura 296. NS-O-221 *Metschnikowia pulcherrima*

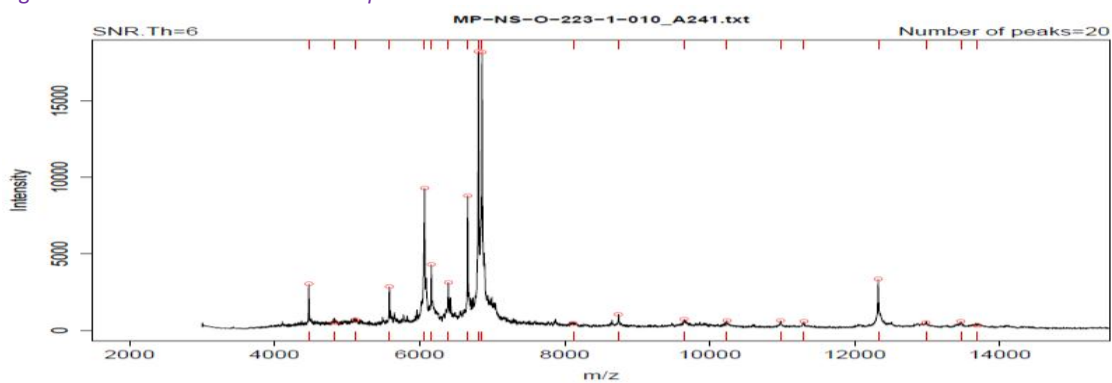


Figura 297. NS-O-223 *Metschnikowia pulcherrima*

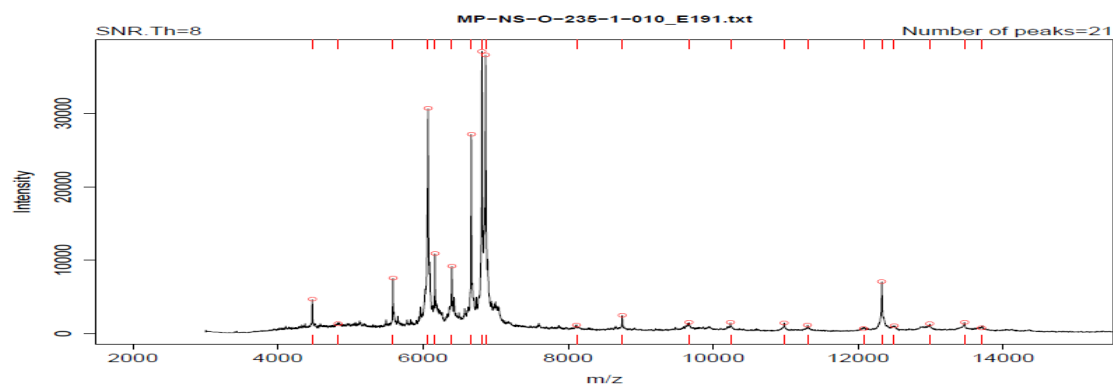


Figura 298. NS-0-235 *Metschnikowia pulcherrima*

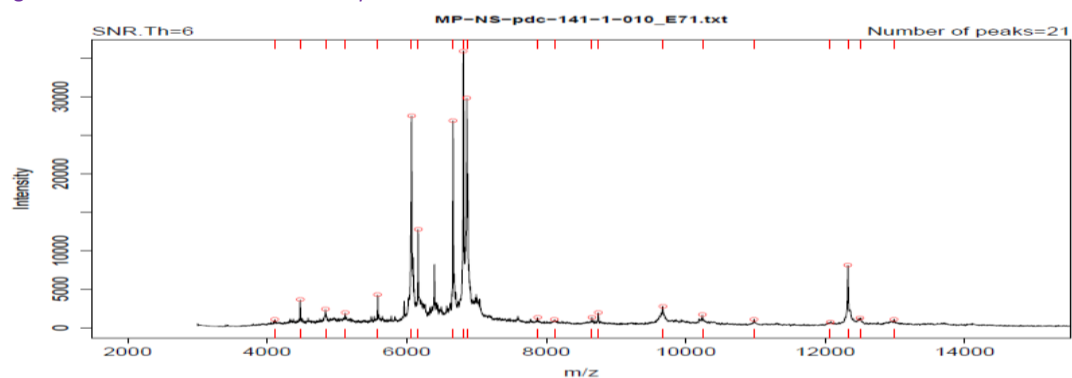


Figura 299. NS-PDC-141 *Metschnikowia pulcherrima*

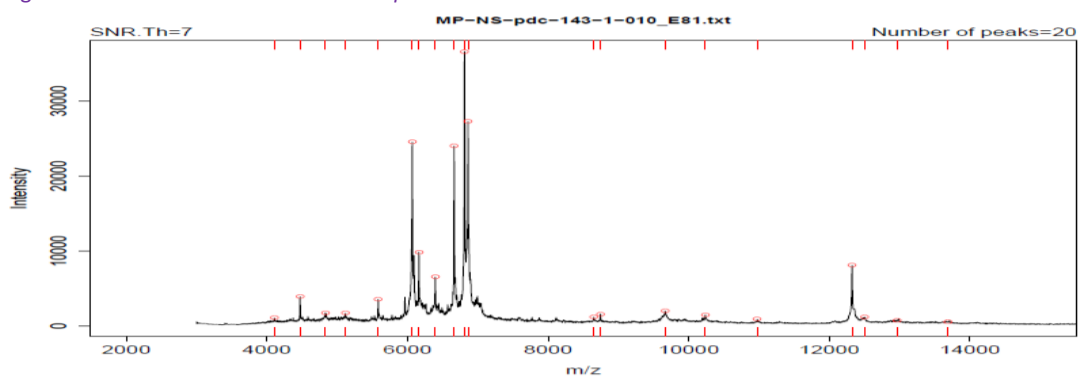


Figura 300 NS-PDC-143 *Metschnikowia pulcherrima*

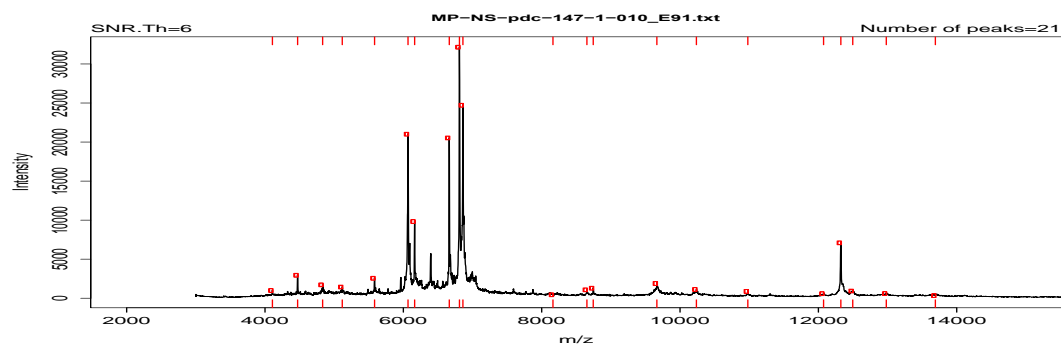


Figura 301 NS-PDC-147 *Metschnikowia pulcherrima*

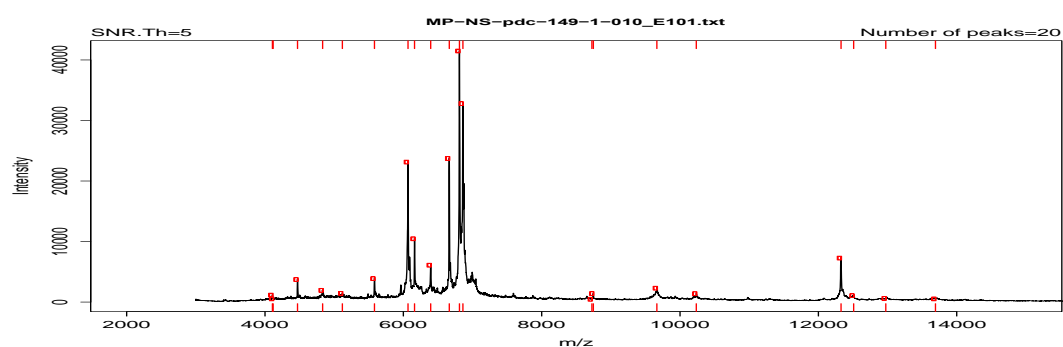


Figura 302. NS-PDC-149 *Metschnikowia pulcherrima*

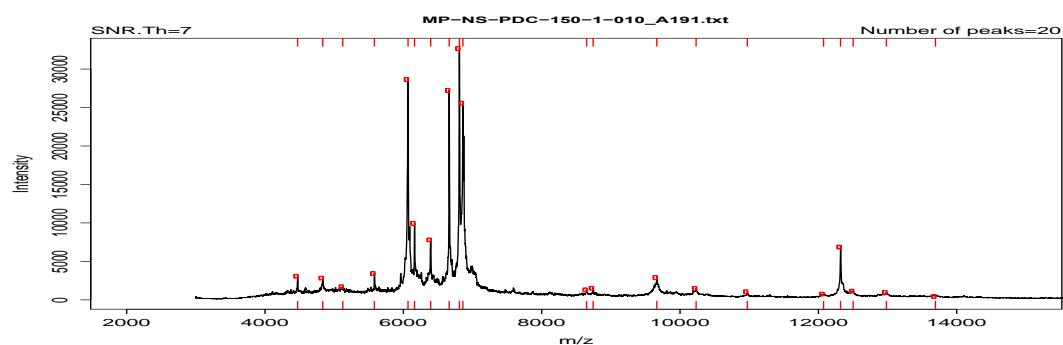


Figura 303. NS.PDC.150 *Metschnikowia pulcherrima*

Especie *Metschnikowia viticola*

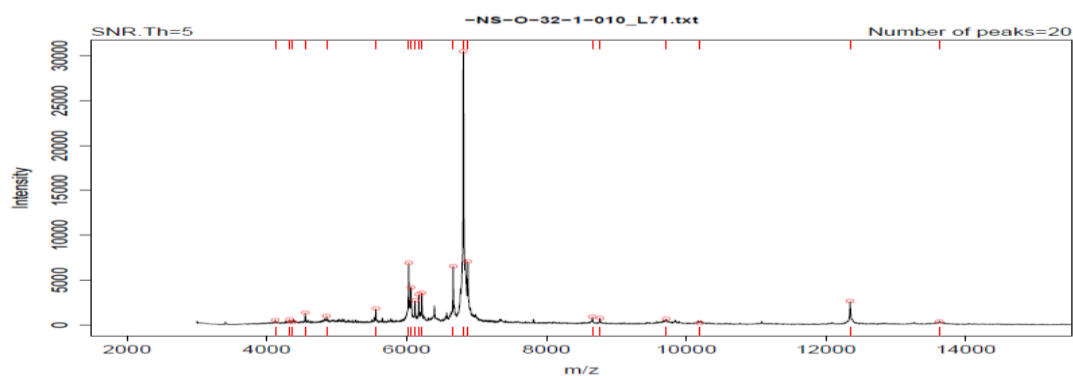


Figura 304. NS-O-32 *Metschnikowia viticola*

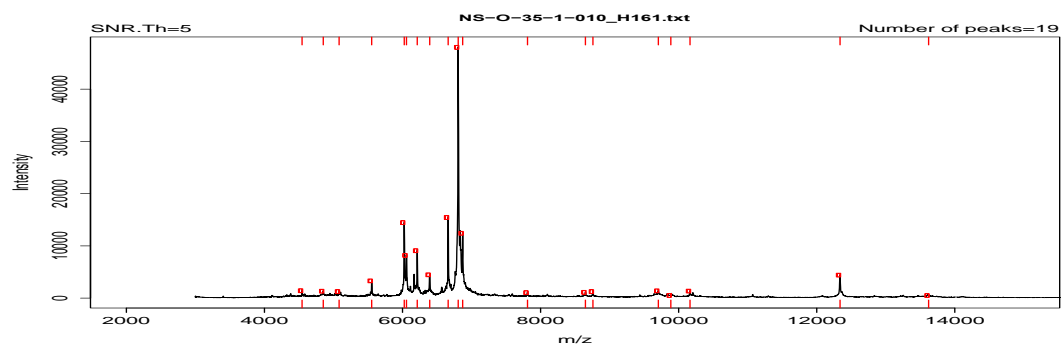


Figura 305. NS-O-35 *Metschnikowia viticola*

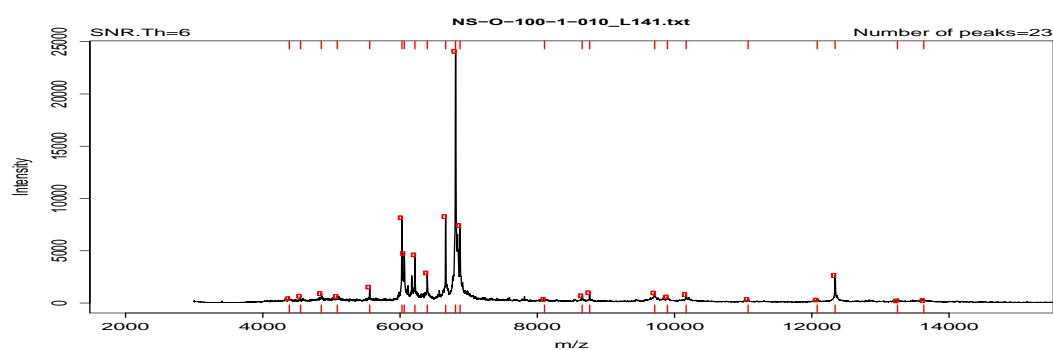


Figura 306. NS-O-100 *Metschnikowia viticola*

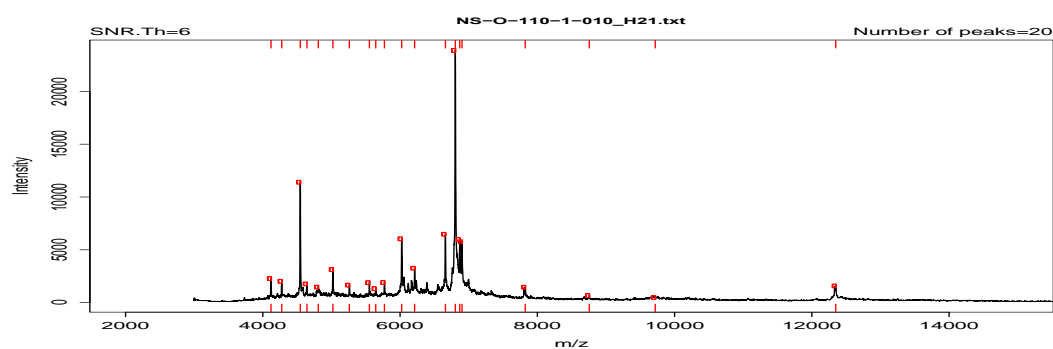


Figura 307. NS-O-110 *Metschnikowia viticola*

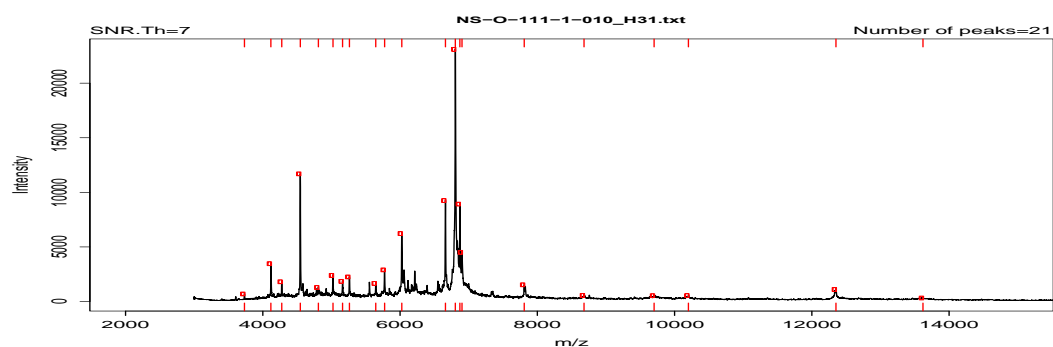


Figura 308. NS-O-111 *Metschnikowia viticola*

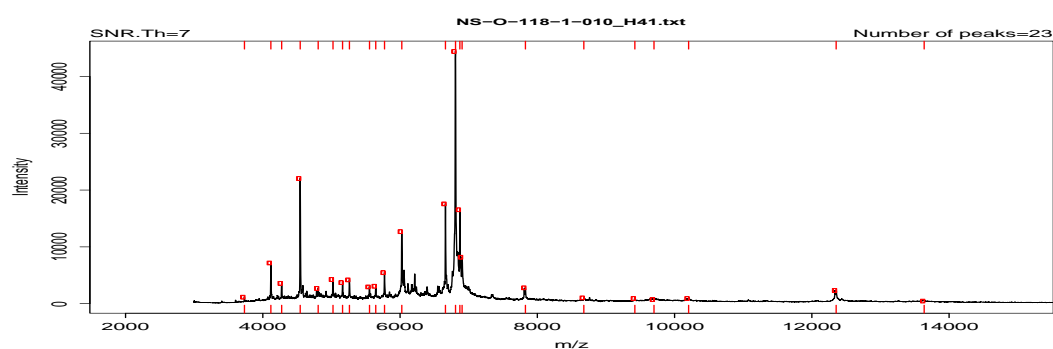


Figura 309. NS-O-118 *Metschnikowia viticola*

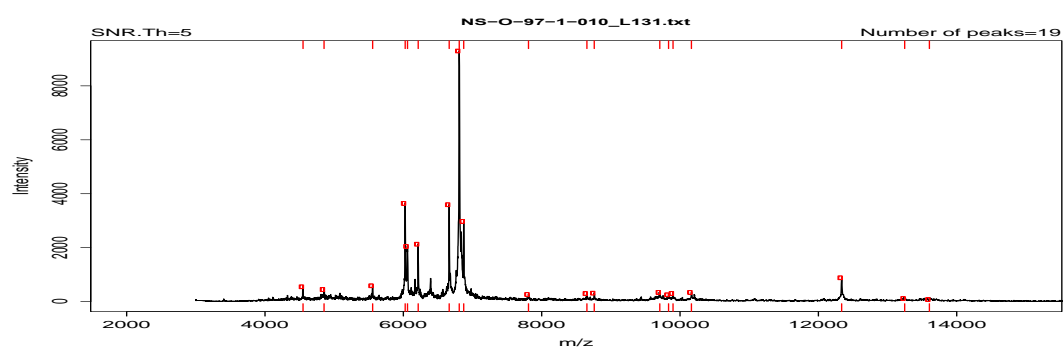


Figura 310. NS-O-97 *Metschnikowia viticola*

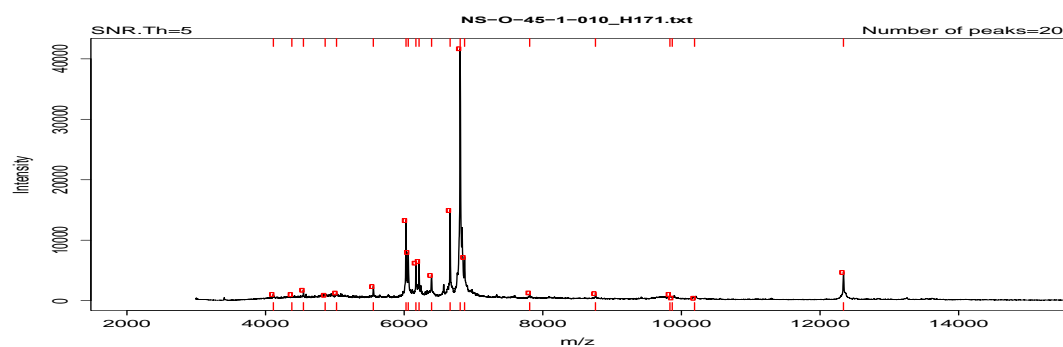


Figura 311. NS- O-45 *Metschnikowia viticola*

Especie *Meyerozyma guilliermondii*

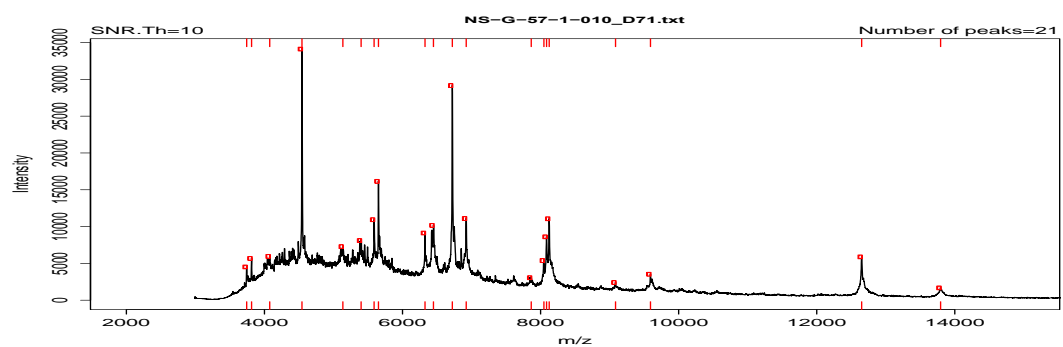


Figura 312. NS-G-57 *Meyerozyma guilliermondii*

Especie *Rhodosporidium toruloides*

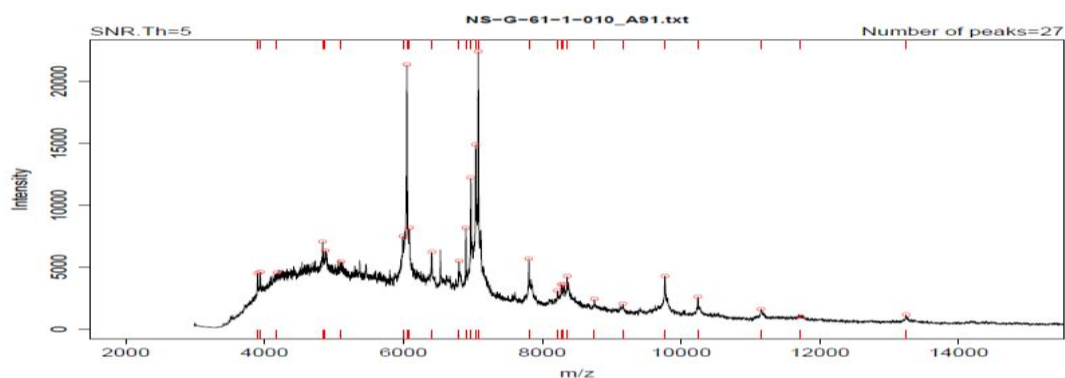


Figura 313. NS-G-61 *Rhodospiridium toruloides*

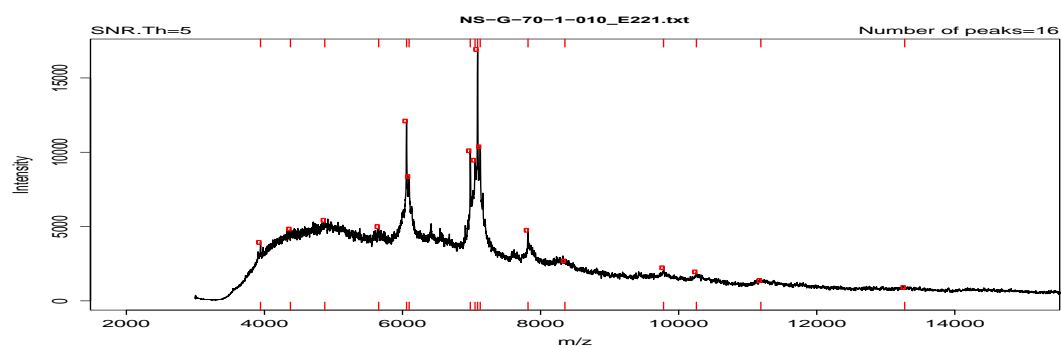


Figura 314. NS-G-70 *Rhodospiridium toruloides*

Especie *Saccharomyces cerevisiae*

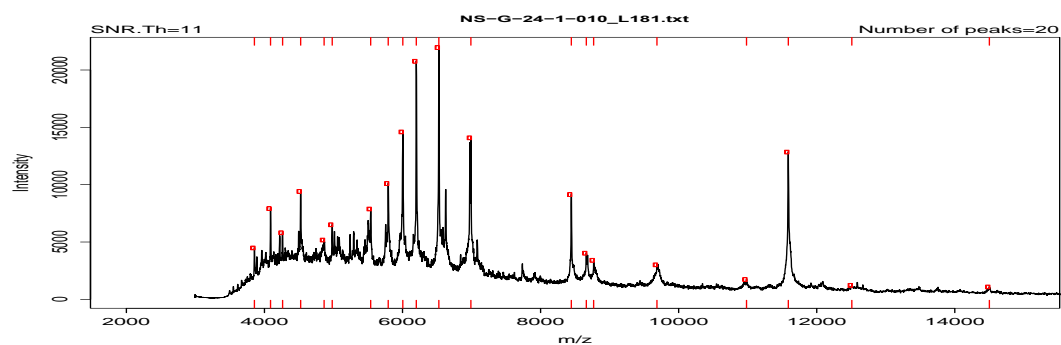


Figura 315. NS-G-24 *Saccharomyces cerevisiae*



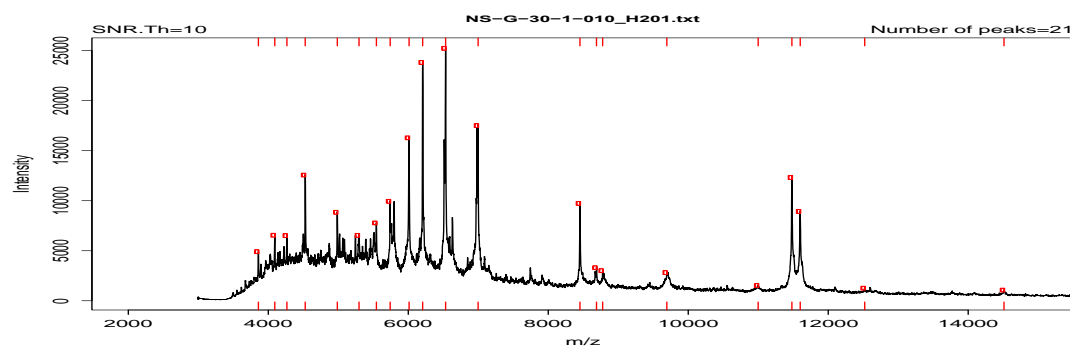


Figura 316. NS-G-30 *Saccharomyces cerevisiae*

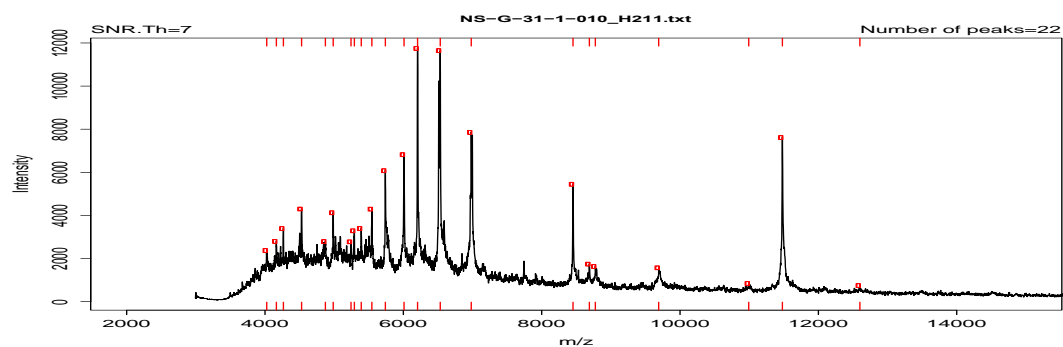


Figura 317. NS-G-31 *Saccharomyces cerevisiae*

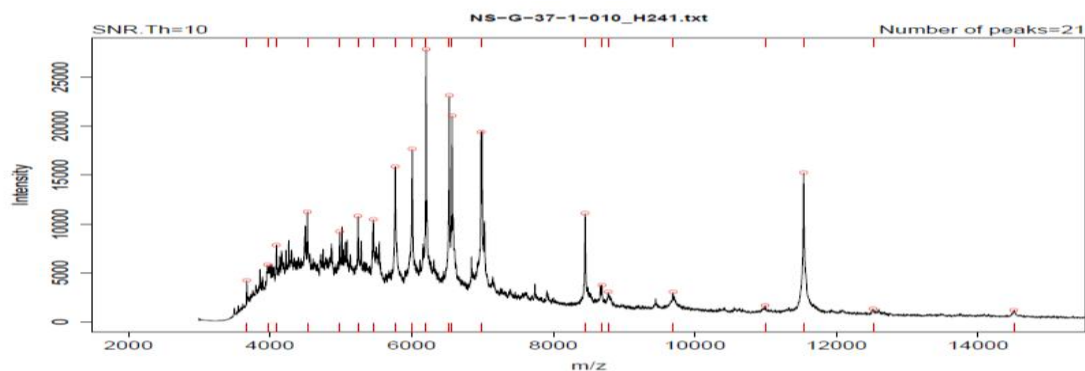


Figura 318. NS-G-37 *Saccharomyces cerevisiae*

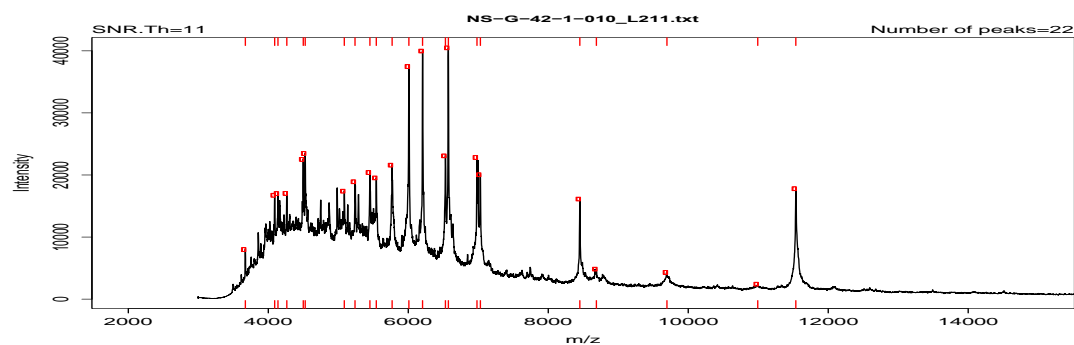


Figura 319. NS-G-42 *Saccharomyces cerevisiae*

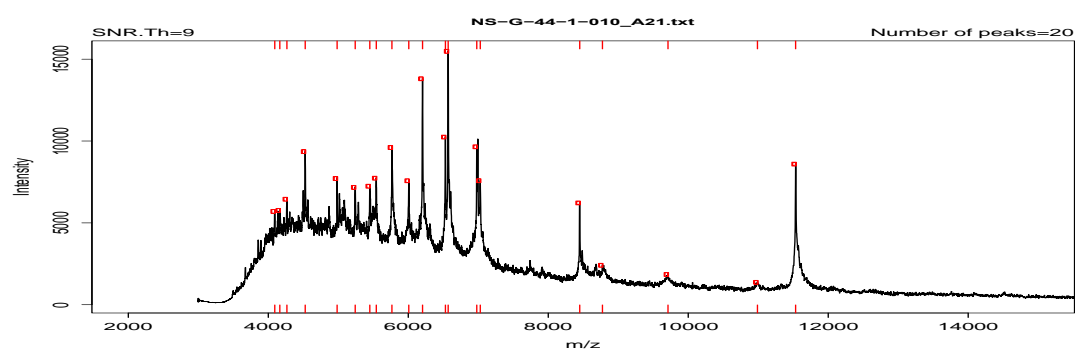


Figura 320. NS-G-44 *Saccharomyces cerevisiae*

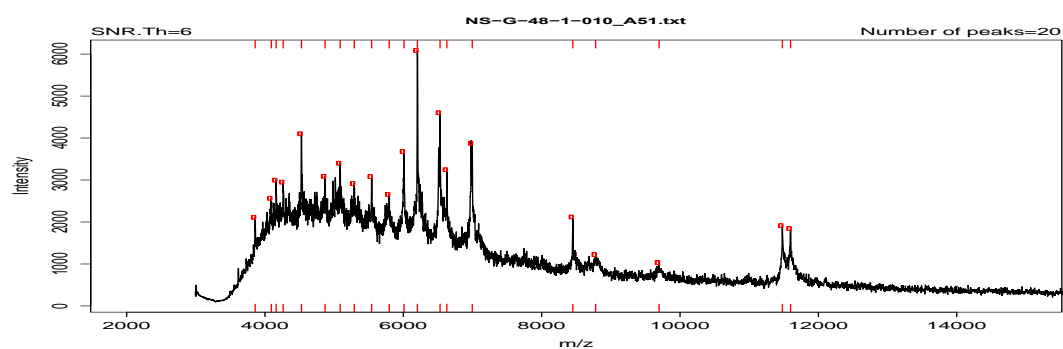


Figura 321. NS-G-48 *Saccharomyces cerevisiae*

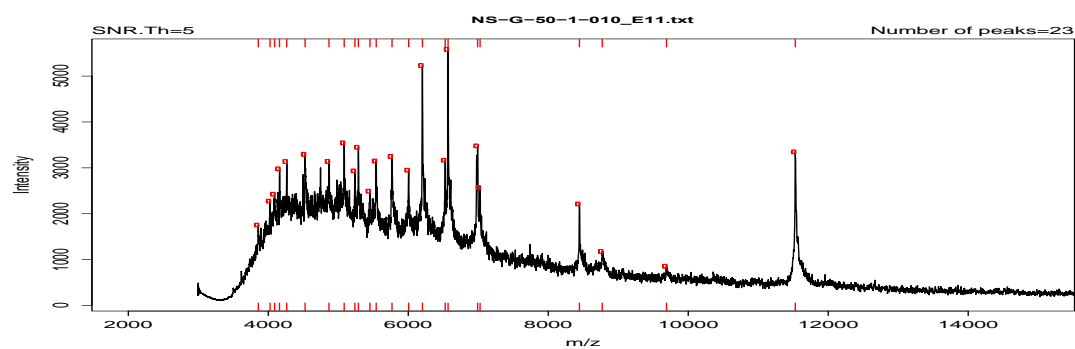


Figura 322. NS-G-50 *Saccharomyces cerevisiae*

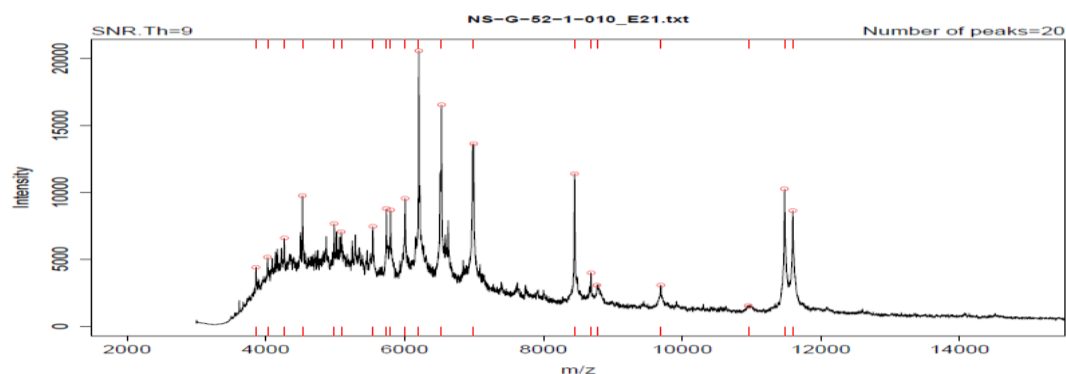


Figura 323. NS-G-52 *Saccharomyces cerevisiae*

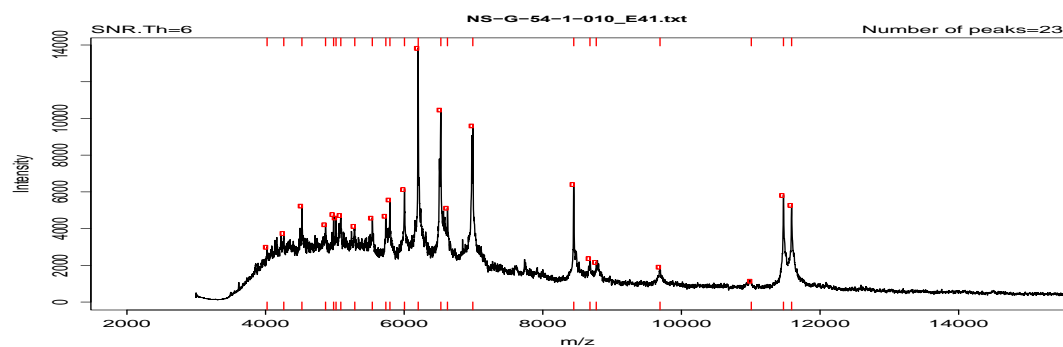


Figura 324. NS-G-54 *Saccharomyces cerevisiae*

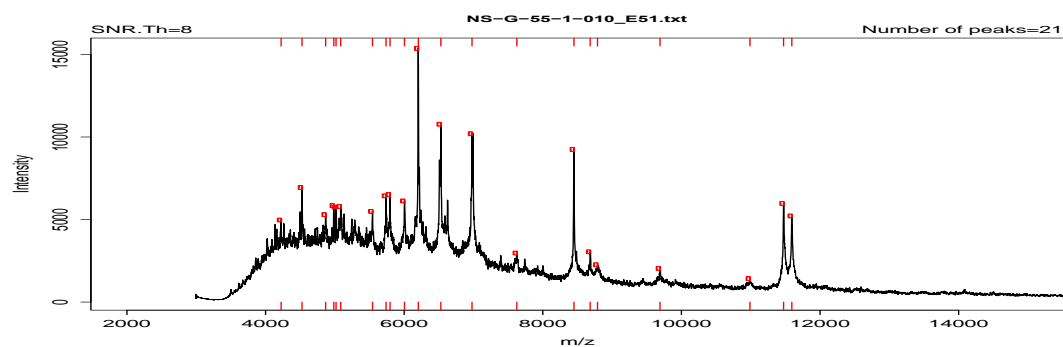


Figura 325. NS-G-55 *Saccharomyces cerevisiae*

Especie *Torulaspora delbrueckii*

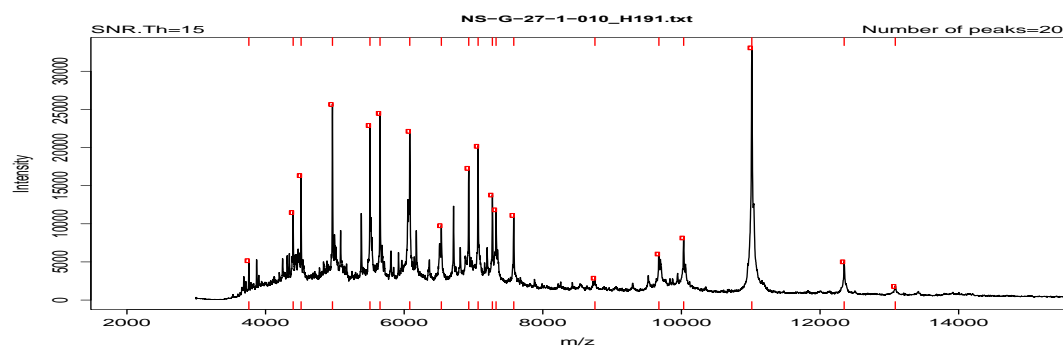


Figura 326. NS-G-27 *Torulaspora delbrueckii*

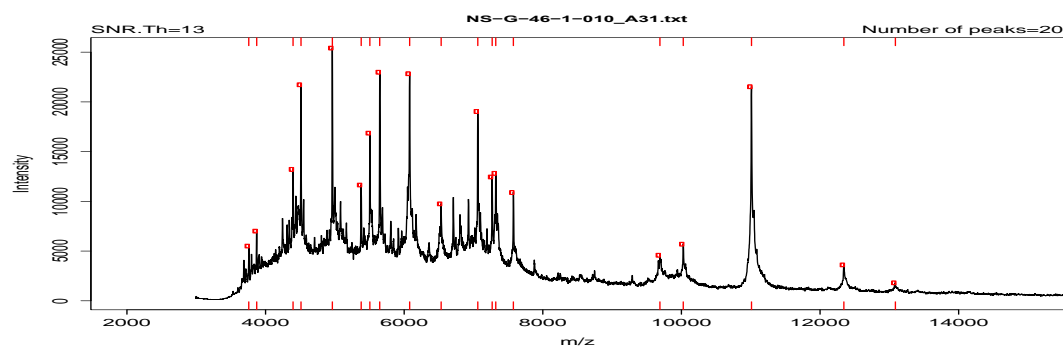


Figura 327. NS-G-46 *Torulaspora delbrueckii*

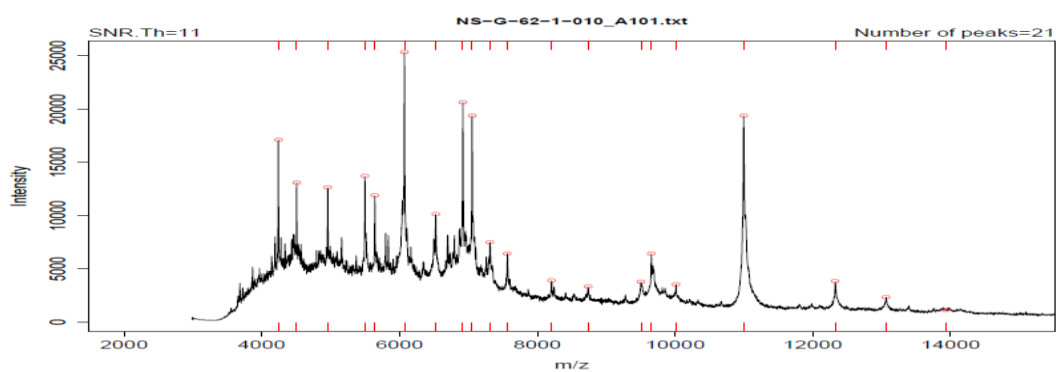


Figura 328. NS-G-62 *Torulaspora delbrueckii*

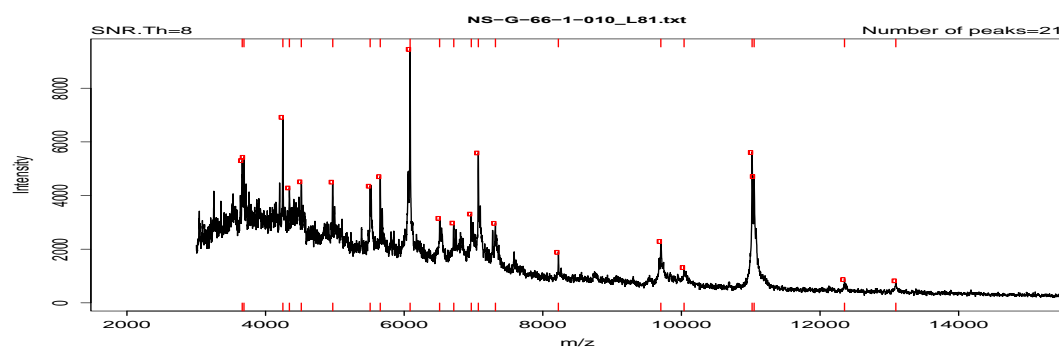


Figura 329. NS-G-66 *Torulaspora delbrueckii*

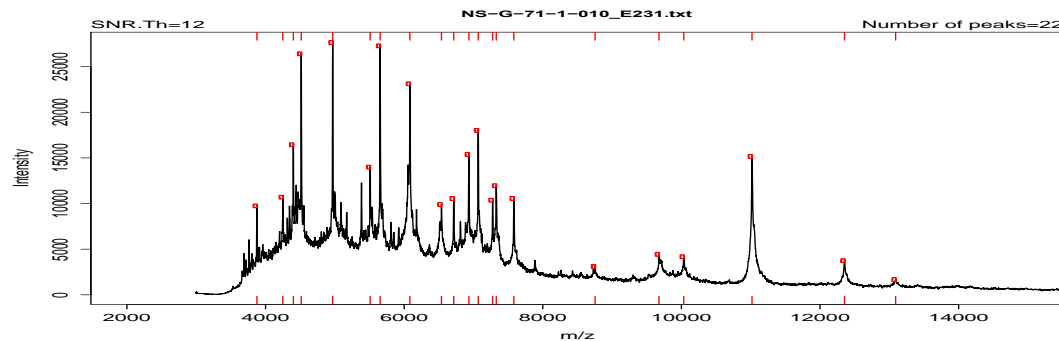


Figura 330. NS-G-71 *Torulaspora delbrueckii*

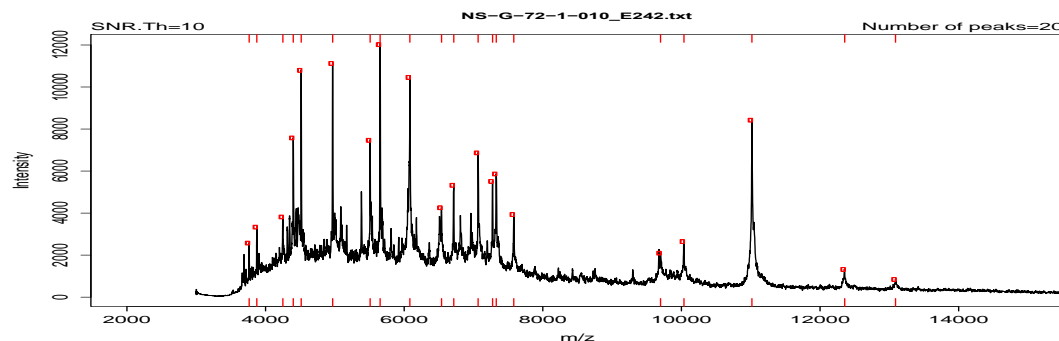


Figura 331. NS-G-72 *Torulaspora delbrueckii*

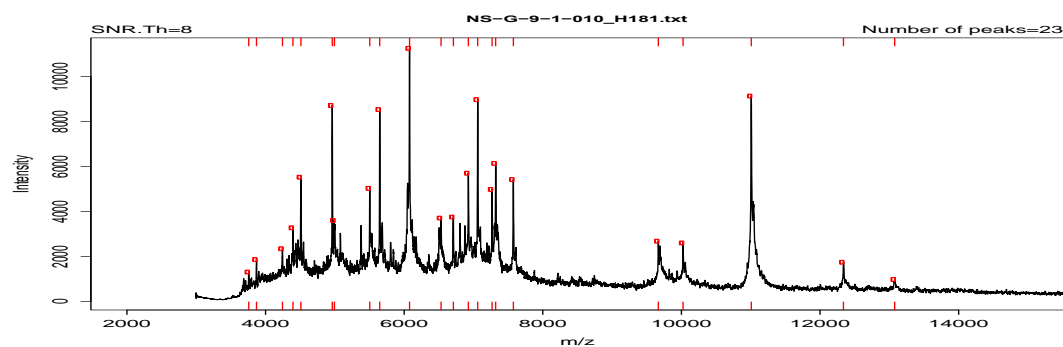


Figura 332. NS-G-9 *Torulaspora delbrueckii*

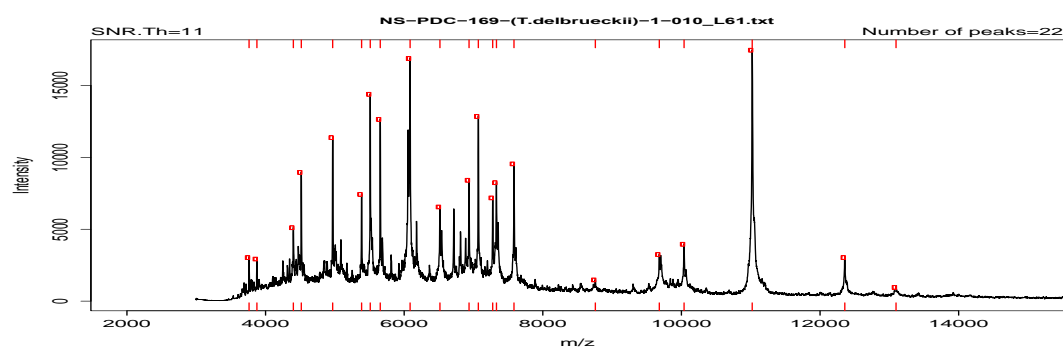


Figura 333. NS-PDC-169 *Torulaspora delbrueckii*

Especie *Wickerhamomyces anomalus*

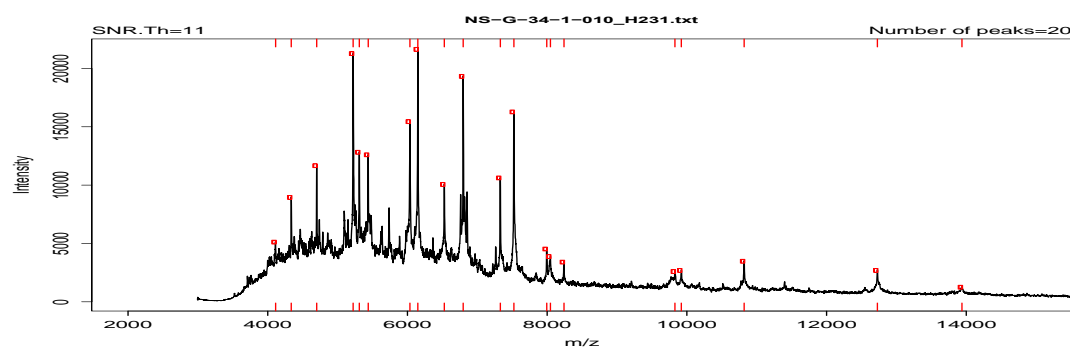


Figura 334. NS-G-34 *Wickerhamomyces anomalus*

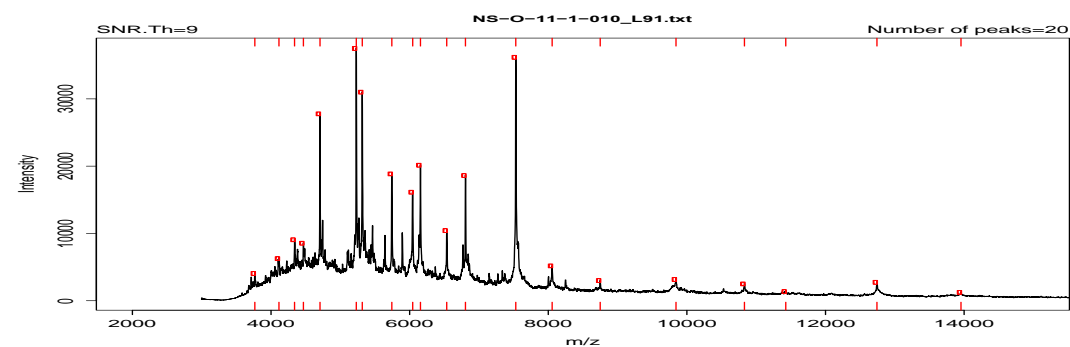


Figura 335. NS-O-11 *Wickerhamomyces anomalus*

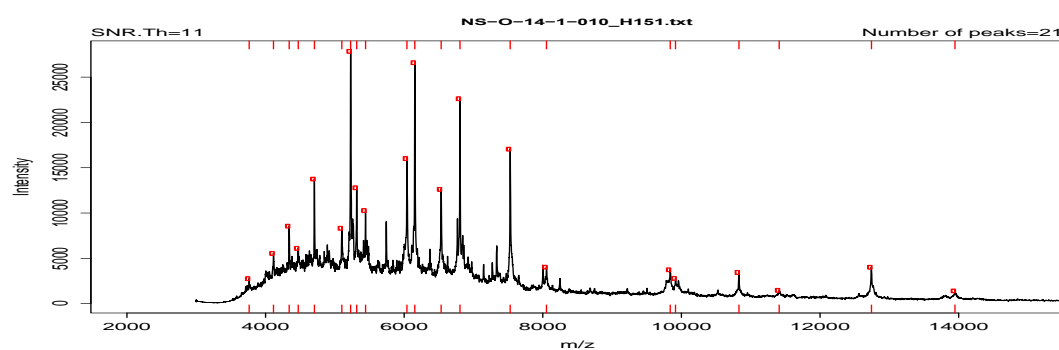


Figura 336. NS-O-14 *Wickerhamomyces anomalus*

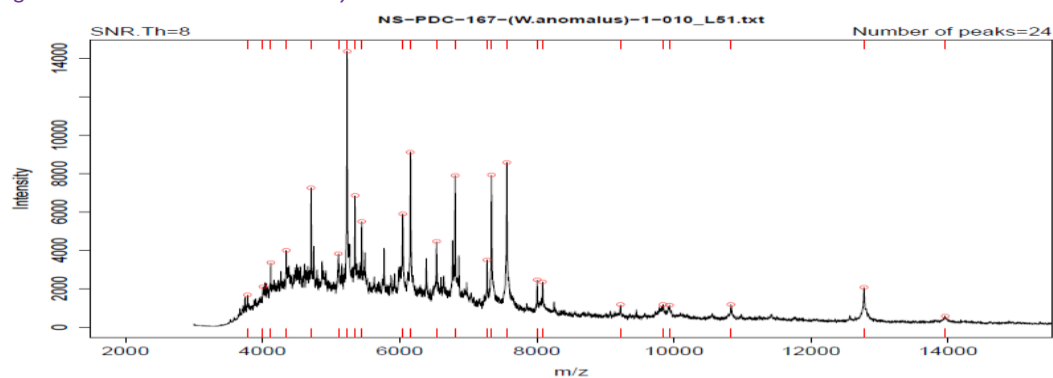


Figura 337. NS-PDC-167 *Wickerhamomyces anomalus*

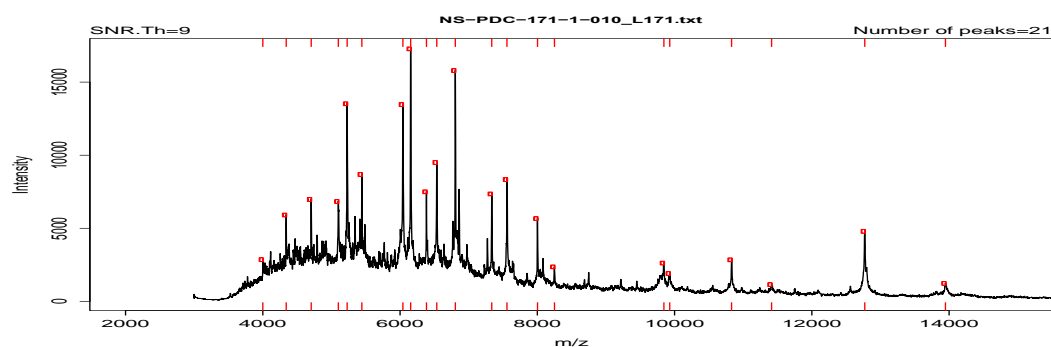


Figura 338. NS-PDC-171 *Wickerhamomyces anomalus*

### Especie *Zygosaccharomyces bailii*

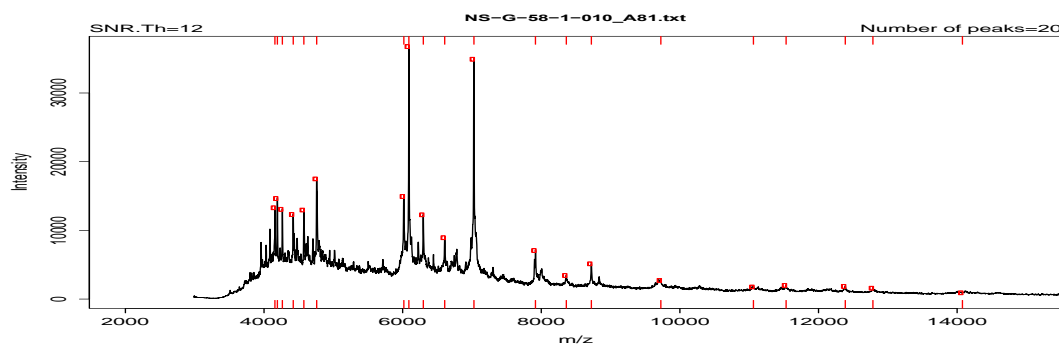


Figura 339. NS-G-58 *Zygosaccharomyces bailii*

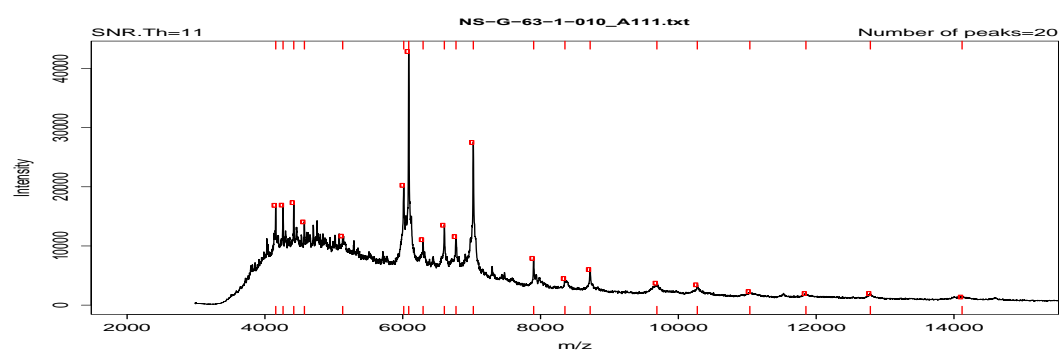


Figura 340. NS-G-63 *Zygosaccharomyces bailii*





# Anexo III

---

Espectros de masas sintéticos  
de cepas vnicas de las especies  
*M. pulcherrima* y *M. fructicola*



## ANEXO III: Espectros de masas sintéticos de cepas vínicas de las especies *M. pulcherrima* y *M. fructicola*

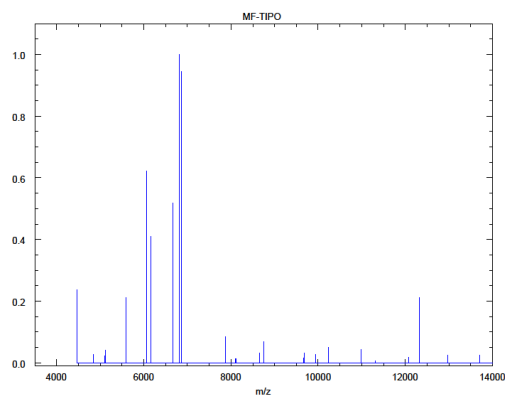


Figura 341. *M. fructicola* tipo CBS8853

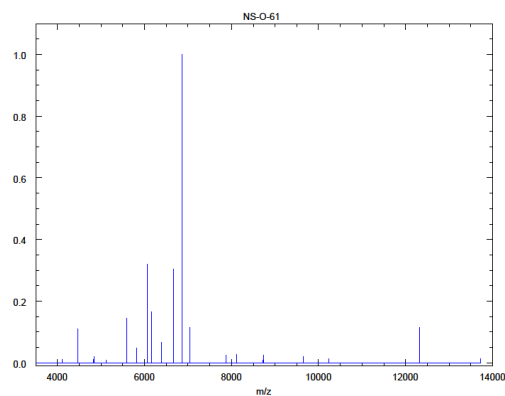


Figura 344. NS-O-61. *M. fructicola*

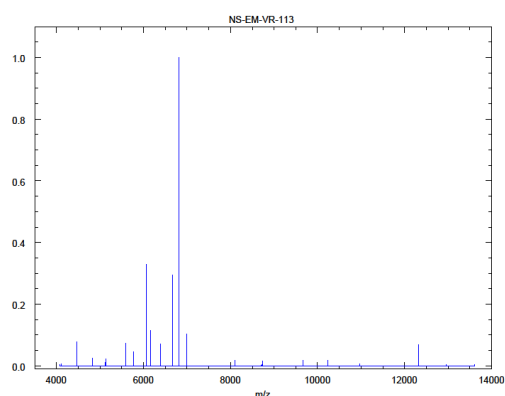


Figura 342. NS-EM-113. *M. fructicola*

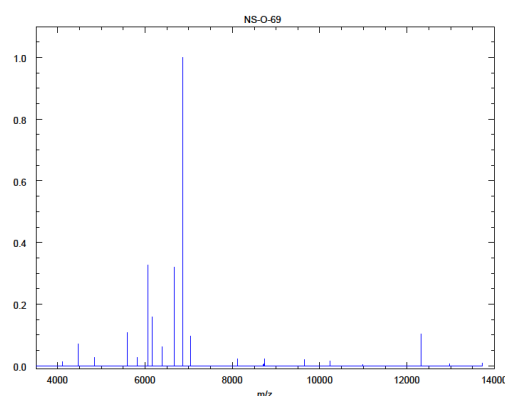


Figura 345. NS-O-69. *M. fructicola*

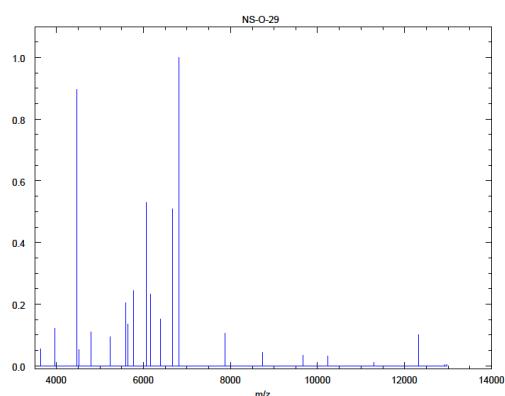


Figura 343. NS-O-29. *M. fructicola*

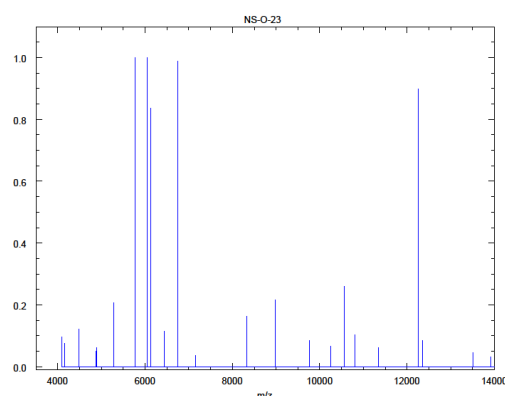


Figura 346. NS-O-23. *H. uvarum*

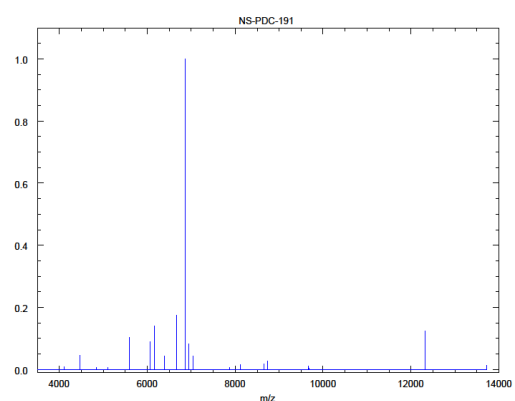


Figura 347. NS-PDC-191. *M. fructicola*

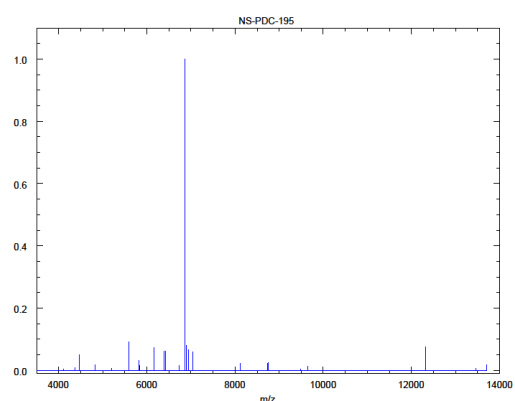


Figura 350. NS-PDC-195. *M. fructicola*

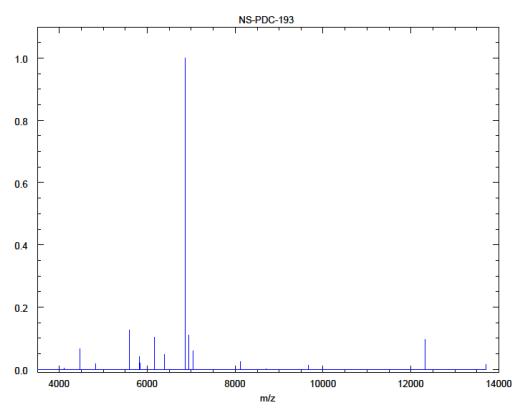


Figura 348. NS-PDC-193. *M. fructicola*

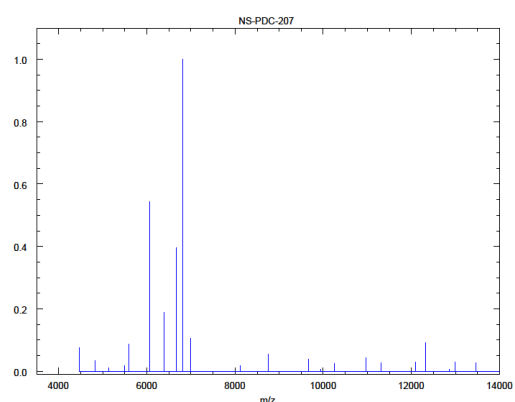


Figura 351. NS-PDC-207. *M. fructicola*

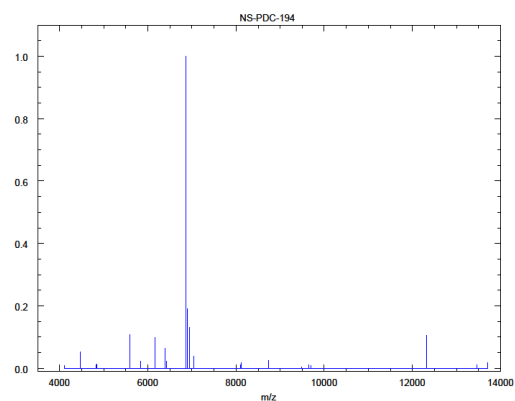


Figura 349. NS-PDC-194. *M. fructicola*

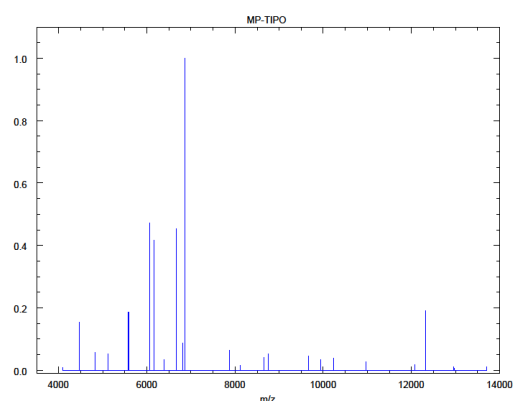


Figura 352. *M. pulcherrima* tipo CECT11202

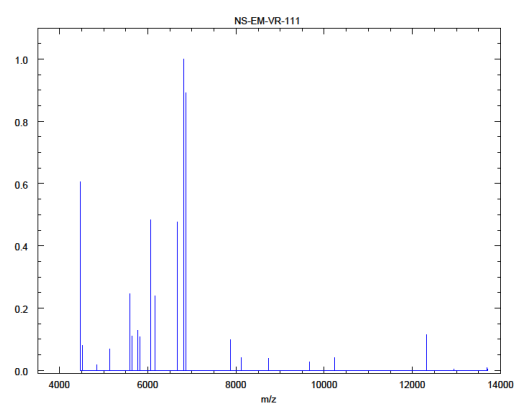


Figura 353. NS-EM-111. *M. pulcherrima*

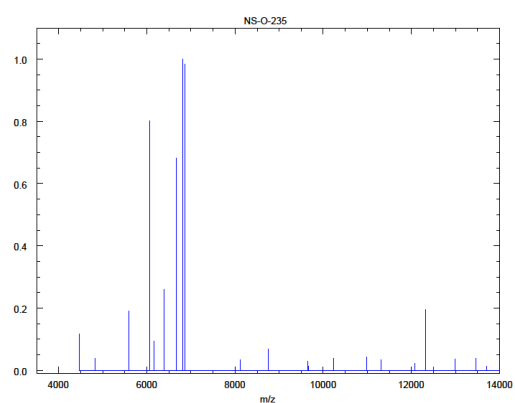


Figura 356. NS-O-235. *M. pulcherrima*

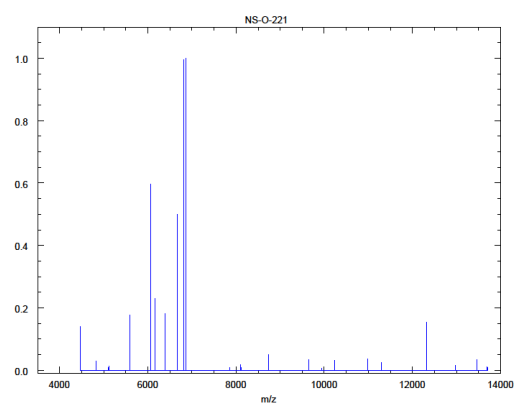


Figura 354. NS-O-221. *M. pulcherrima*

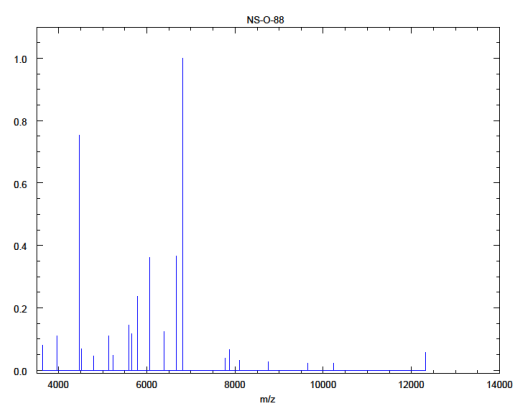


Figura 357. NS-O-88. *M. pulcherrima*

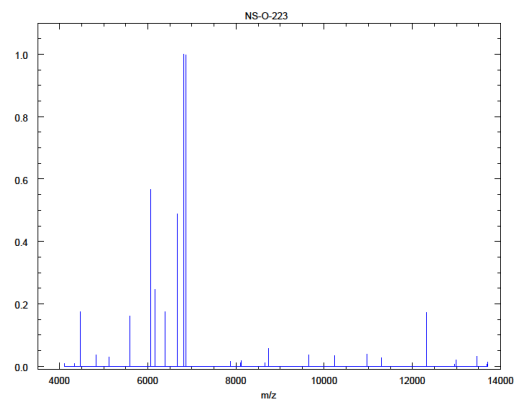


Figura 355. NS-O-223. *M. pulcherrima*

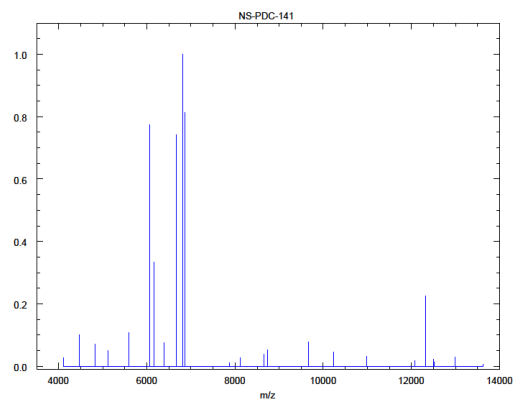


Figura 358. NS-PDC-141. *M. pulcherrima*

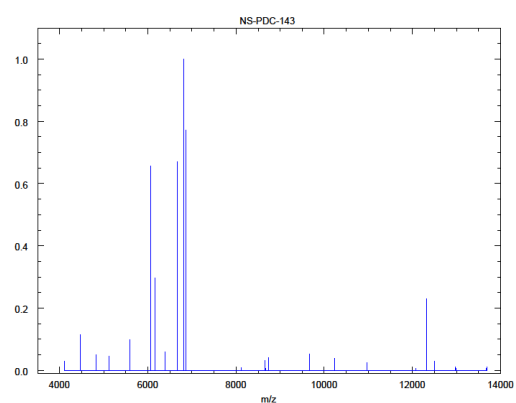


Figura 359. NS-PDC-143. *M. pullcherrima*

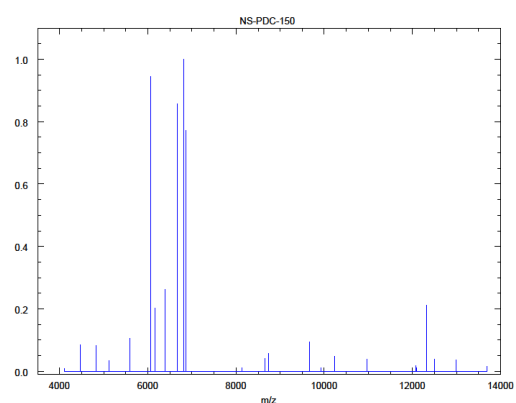


Figura 362. NS-PDC-150. *M. pullcherrima*

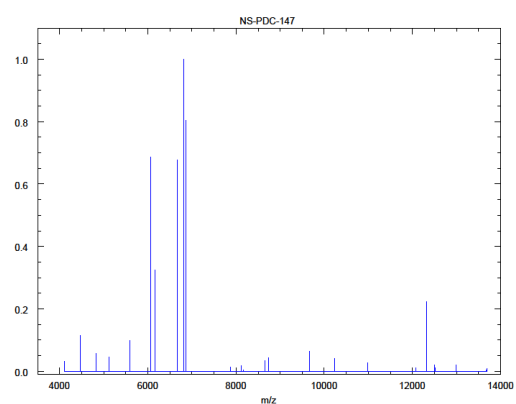


Figura 360. NS-PDC-147. *M. pullcherrima*

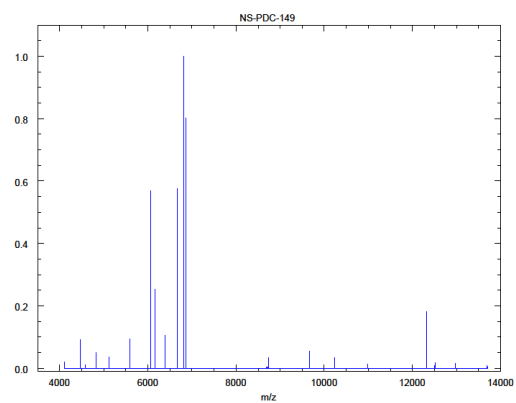


Figura 361. NS-PDC-149. *M. pullcherrima*

# Anexo IV

---

Espectros de masas sintéticos de  
cepas vínicas de especies *no-*  
*Saccharomyces*





## ANEXO IV: Espectros de masas sintéticos de cepas vínicas de especies no-Saccharomyces

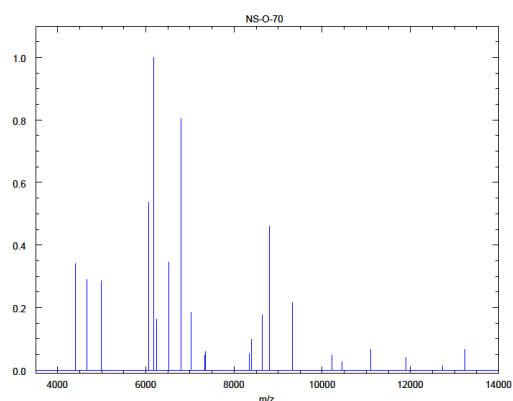


Figura 363. NS-O-70. *Aureobasidium pullulans*

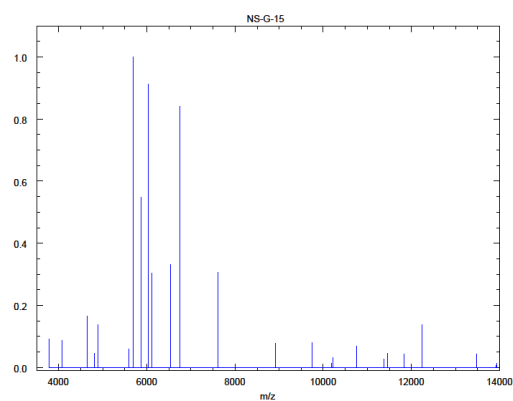


Figura 366. NS-G-15 *Hanseniaspora opuntiae*

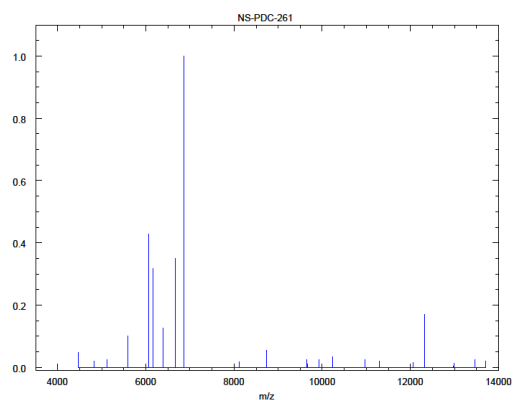


Figura 364. NS-PDC-261 *Cryptococcus amyloletus*

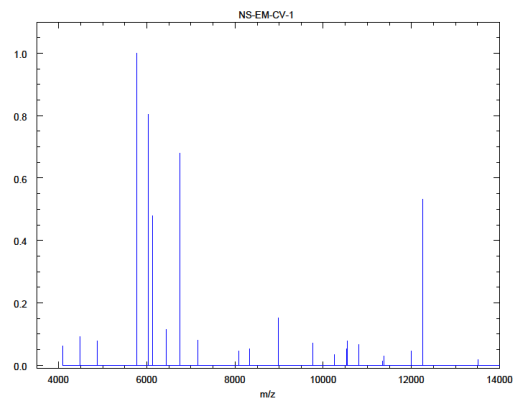


Figura 367. NS-EM-CV-1 *Hanseniaspora uvarum*

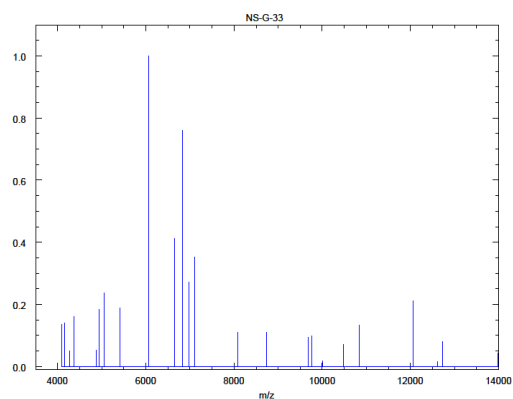


Figura 365. NS-G-33 *Hanseniaspora osmophila*

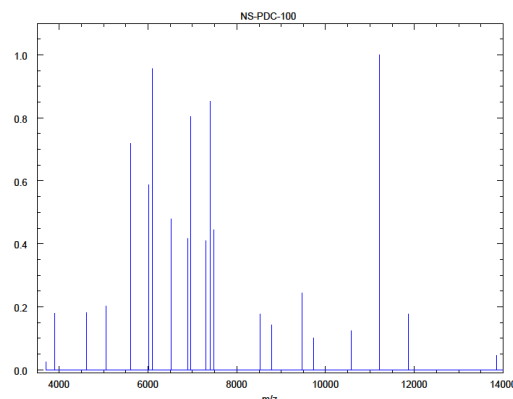


Figura 368. NS-PDC-100 *Kluyveromyces marxianus*

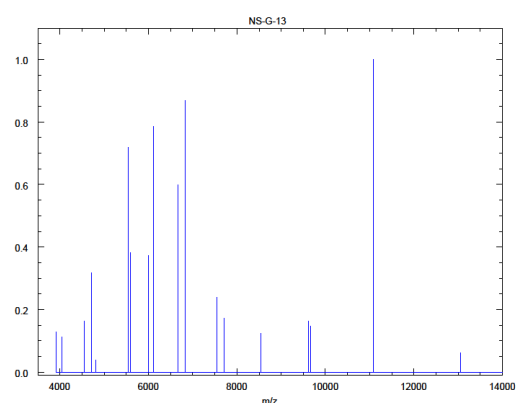


Figura 369. NS-G-13 *Lachancea thermotolerans*

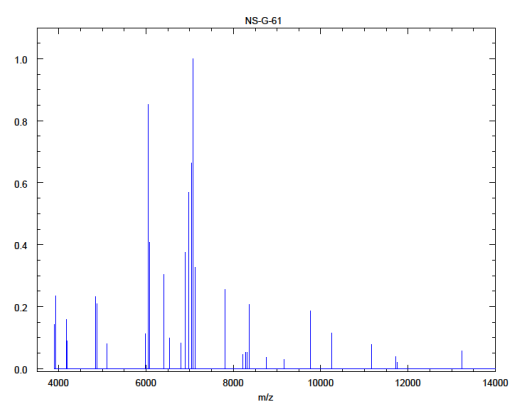


Figura 372. NS-G-61 *Rhodosporidium toruloides*

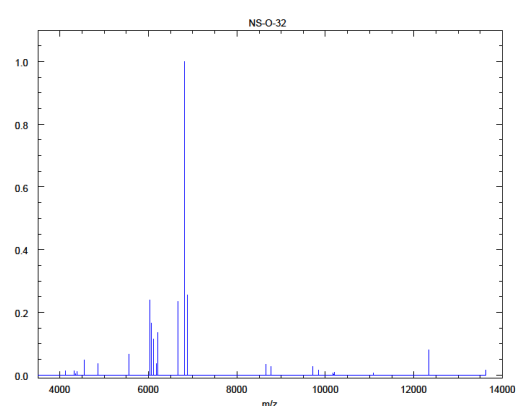


Figura 370. NS-O-32 *Metschnikowia viticola*

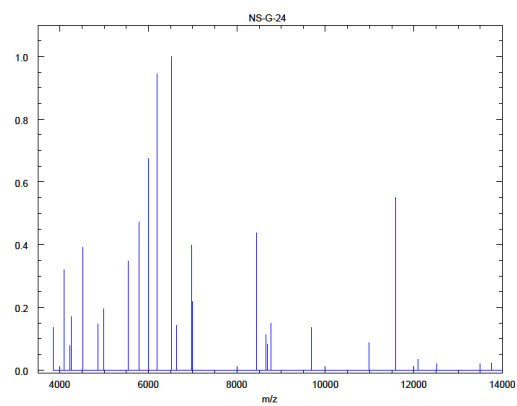


Figura 373. NS-G-24 *Saccharomyces cerevisiae*

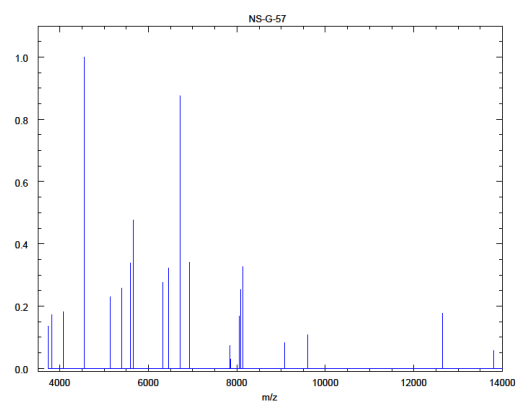


Figura 371. NS-G-57 *Meyerozyma guilliermondii*

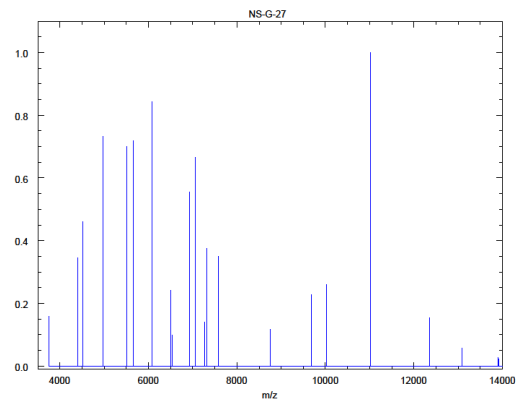


Figura 374. NS-G-27 *Torulaspora delbrueckii*

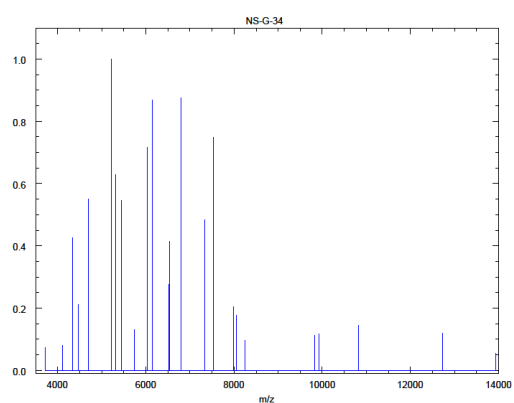


Figura 375. NS-G-34 *Wickerhamomyces anomalus*

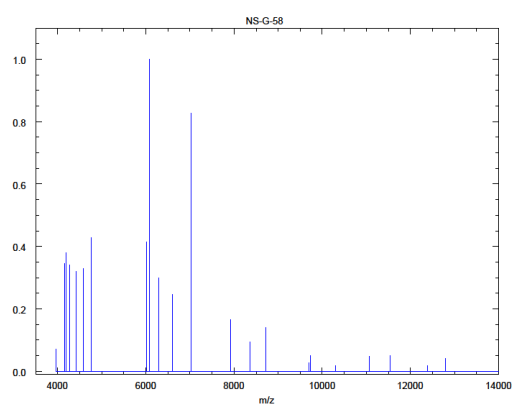


Figura 376. NS-G-58 *Zygosaccharomyces bailii*



# Anexo V

---

Validación de la librería  
Espectros de masas



## ANEXO V: Validación de la librería. Espectros de masas

Espectros de masas estudio validación cepa NS-EM-119:

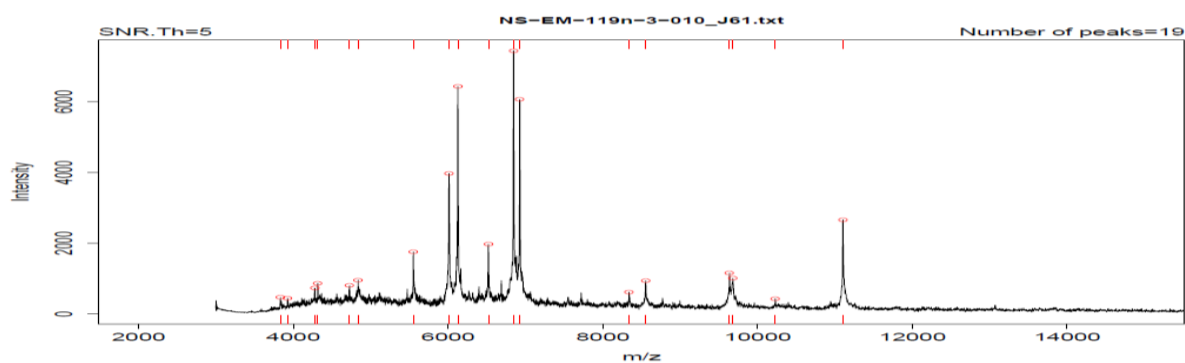


Figura 377. Espectro de masas cepa NS-EM-119 nuevo crecimiento

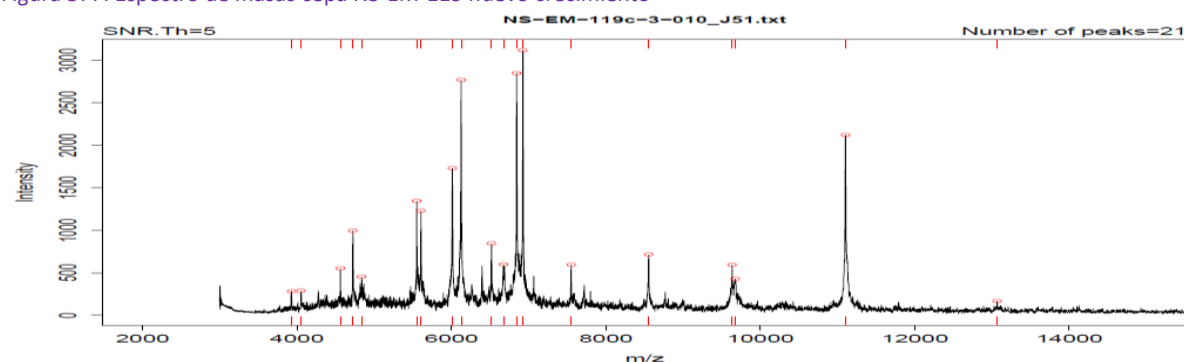


Figura 378. Espectro de masas cepa NS-EM-119 muestra congelada 1

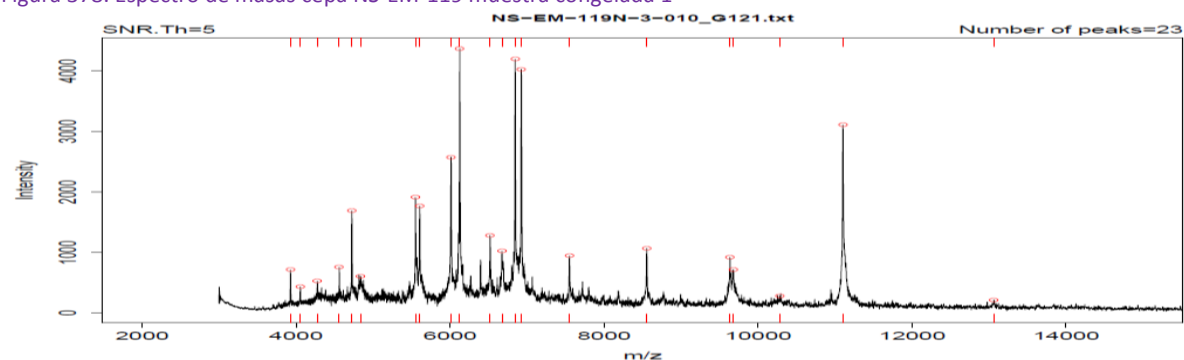


Figura 379. Espectro de masas cepa NS-EM-119 muestra congelada 2

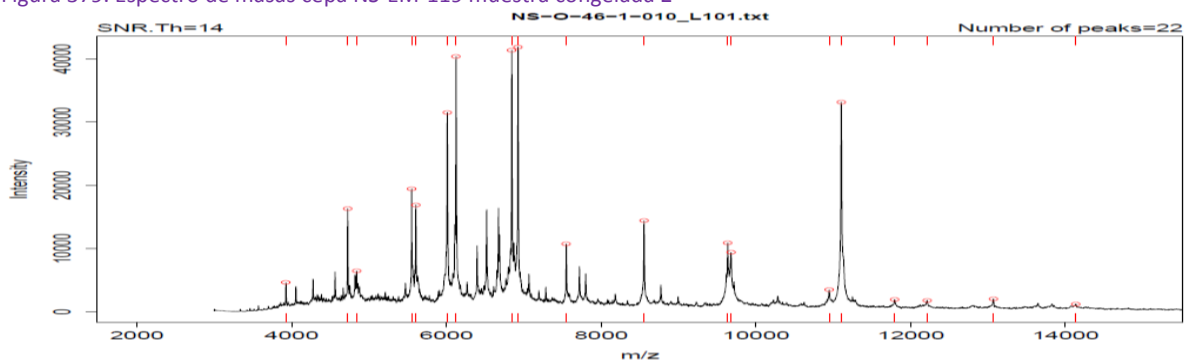


Figura 380. Espectro de masas de librería cepa NS-O-46, 1ª identificación en análisis de NS-EM-119 nuevo crecimiento

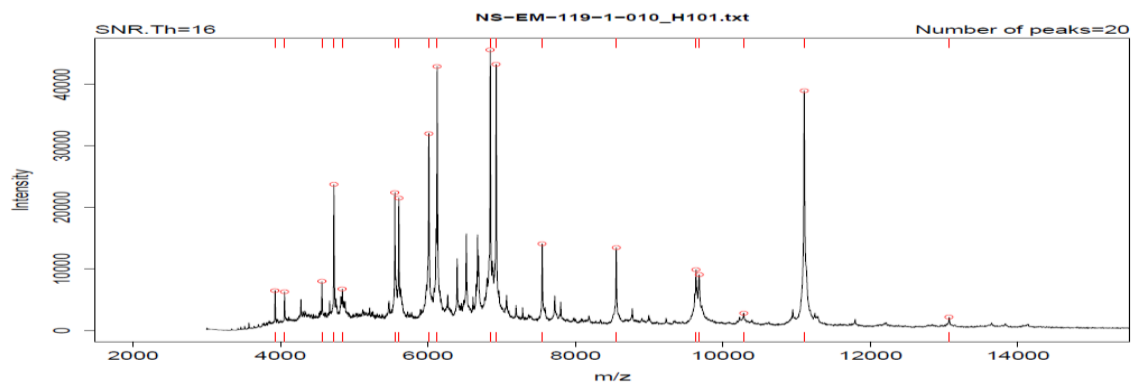


Figura 381. .Espectro de masas de librería cepa NS-EM-119

Espectros de masas estudio validación cepa NS-O-11:

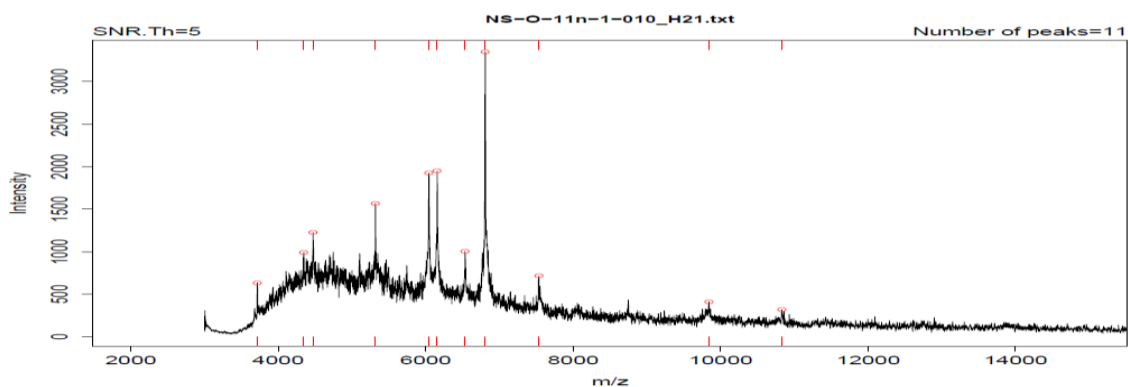


Figura 382. Espectro de masas cepa NS-O-11 nuevo crecimiento

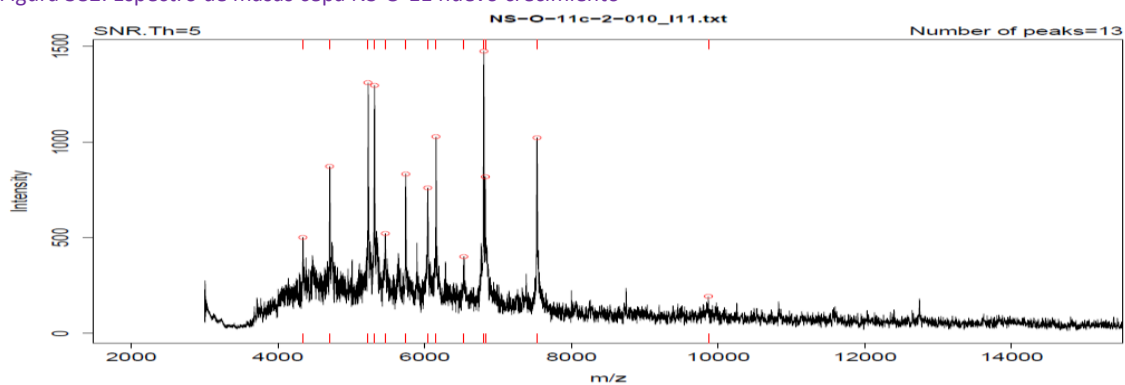


Figura 383. Espectro de masas cepa NS-O-11 muestra congelada 1

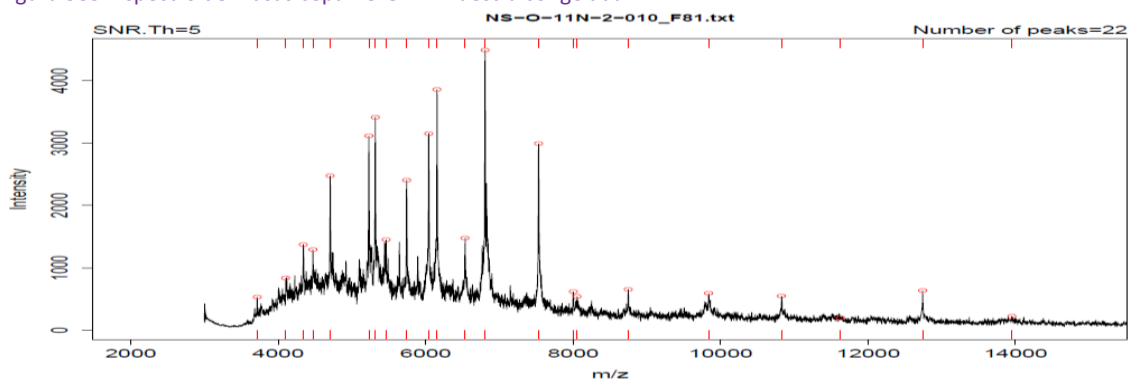


Figura 384. Espectro de masas cepa NS-O-11 muestra congelada 2



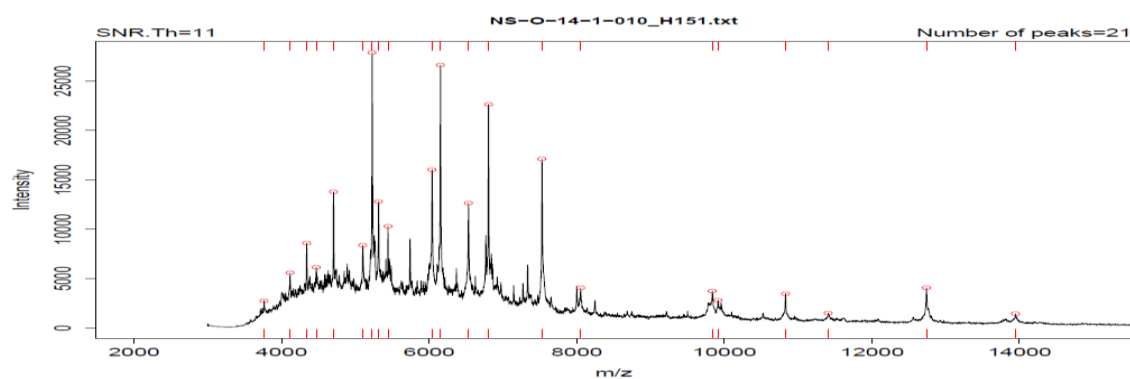


Figura 385. Espectro de masas de librería cepa NS-O-14, 1ª identificación en análisis de NS-O-11 nuevo crecimiento

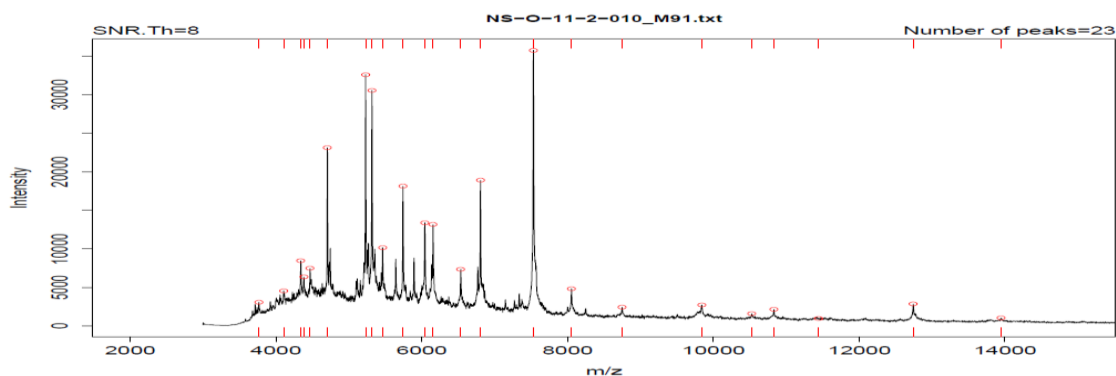


Figura 386. Espectro de masas de librería cepa NS-O-11

Espectros de masas estudio validación cepa NS-O-46:

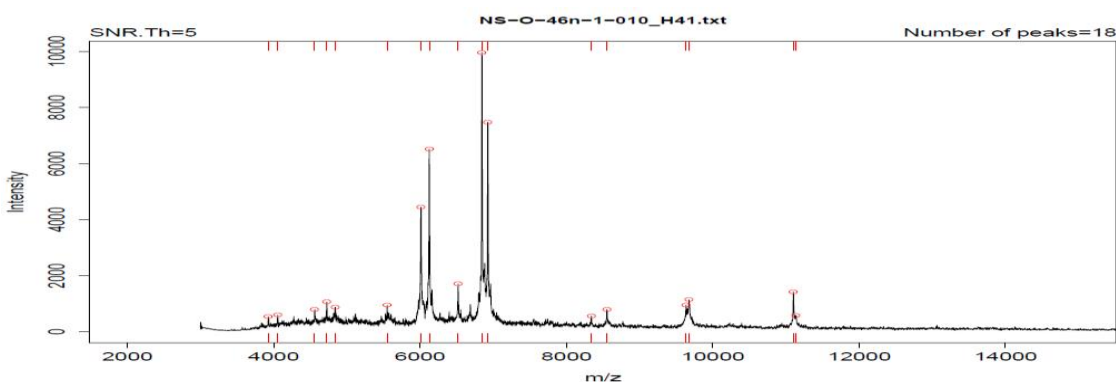


Figura 387. Espectro de masas cepa NS-O-46 nuevo crecimiento

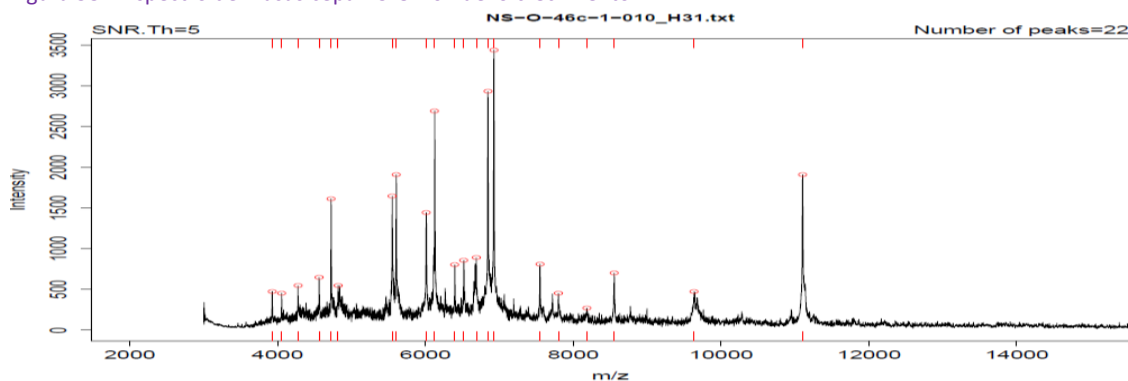


Figura 388. Espectro de masas cepa NS-O-46 muestra congelada 1

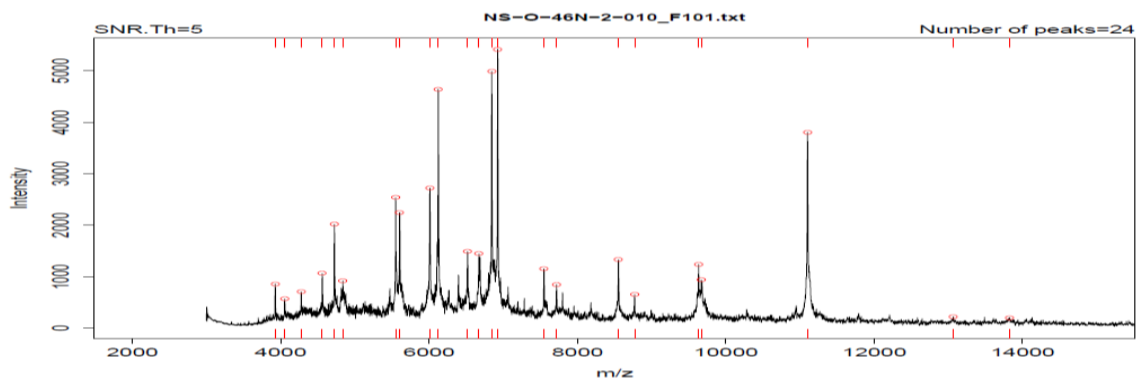


Figura 389. Espectro de masas cepa NS-O-46 muestra congelada 2

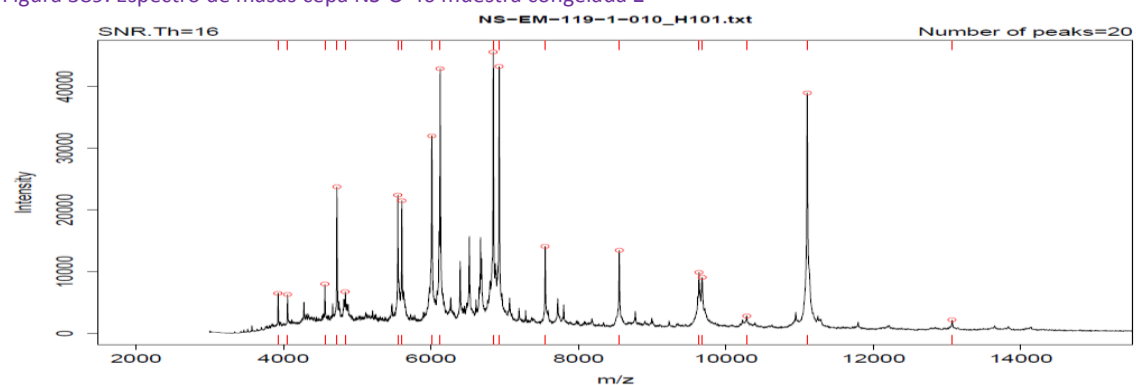


Figura 390. Espectro de masas de librería cepa NS-EM-119, 1ª identificación en análisis de NS-O-46 muestra congelada 1 y 2

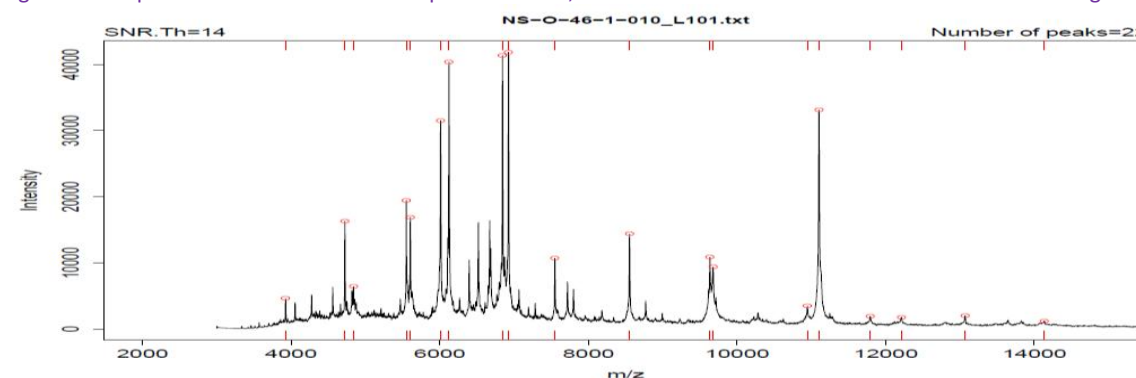


Figura 391. . Espectro de masas de librería cepa NS-O-46

Espectros de masas estudio validación cepa NS-PDC-99:

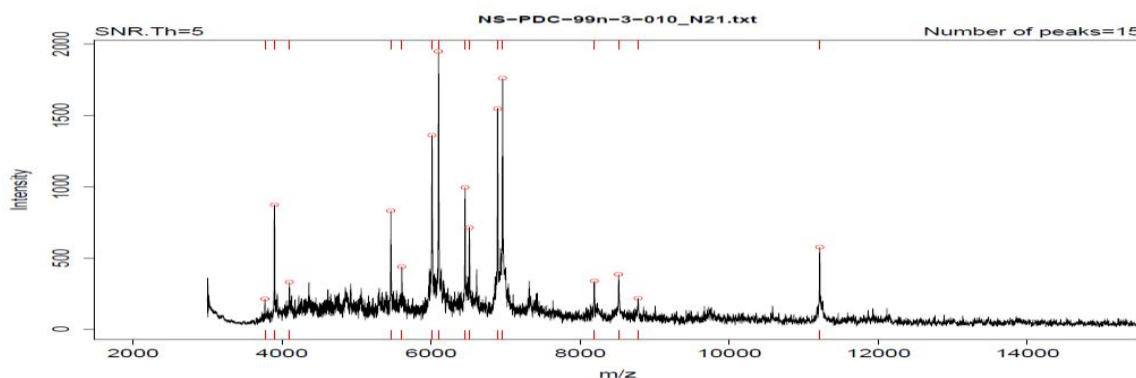


Figura 392. Espectro de masas cepa NS-PDC-99 nuevo crecimiento

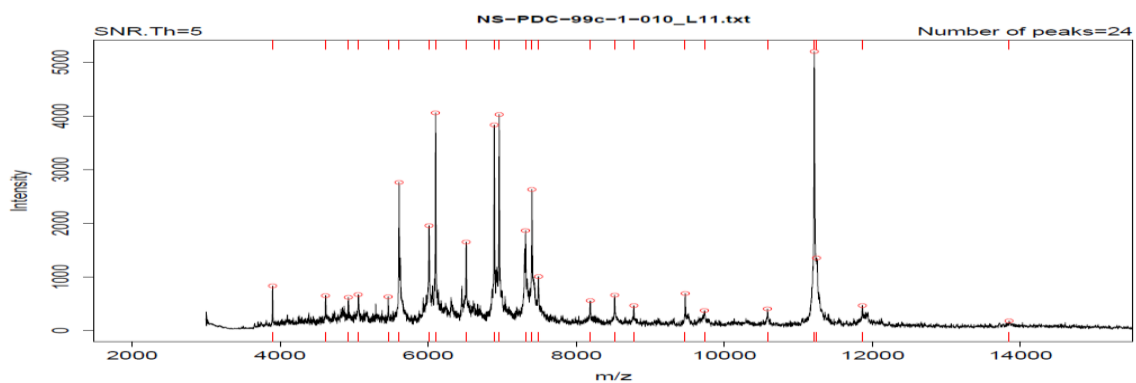


Figura 393. Espectro de masas cepa NS-PDC-99 muestra congelada 1

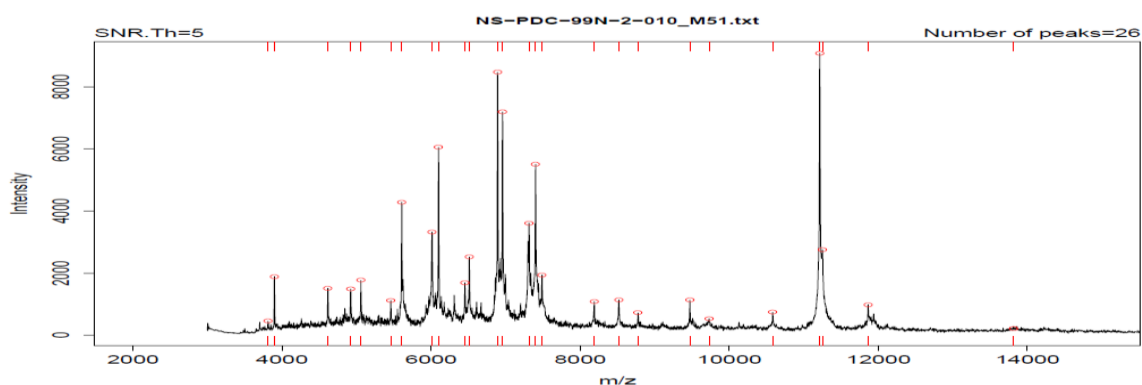


Figura 394. Espectro de masas cepa NS-PDC-99 muestra congelada 2

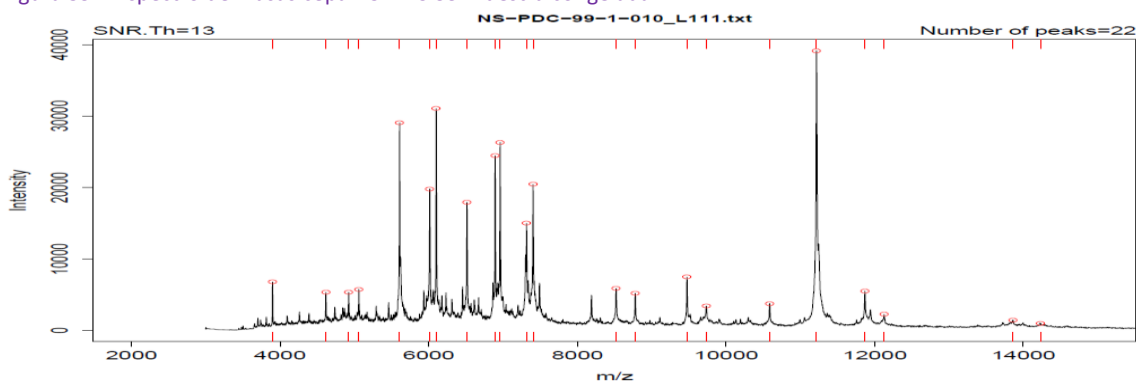


Figura 395. Espectro de masas de librería cepa NS-PDC-99

Espectros de masas estudio validación cepa NS-PDC-262:

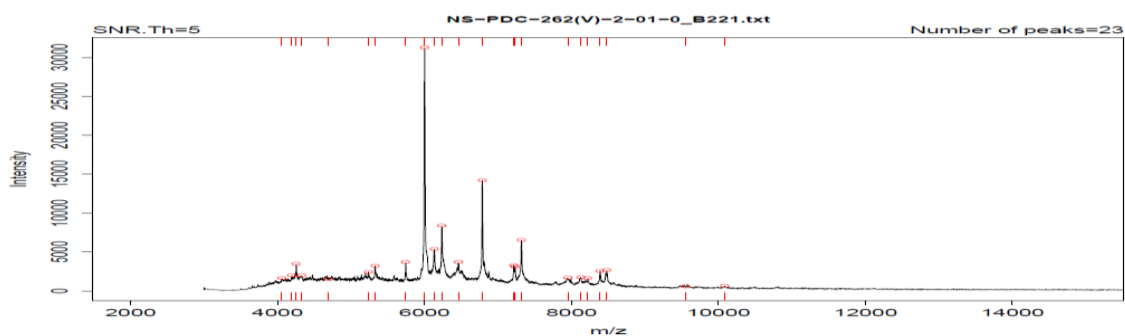


Figura 396. Espectro de masas cepa NS-PDC-262 nuevo crecimiento

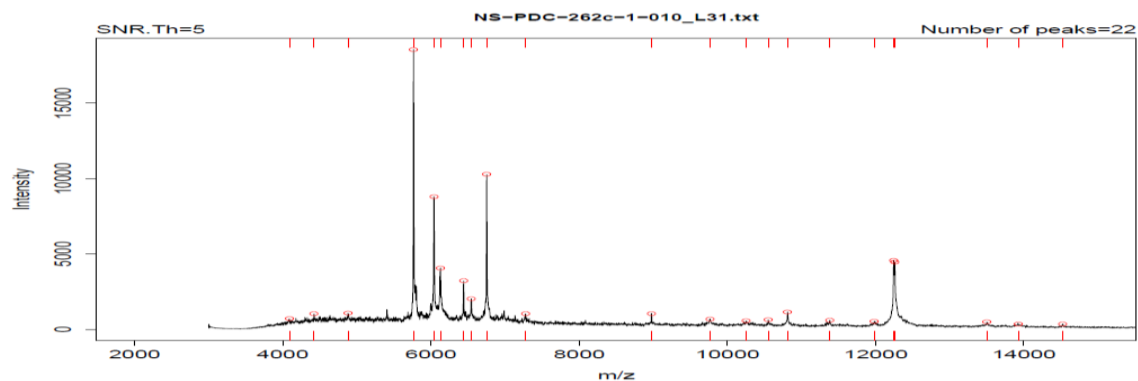


Figura 397. Espectro de masas cepa NS-PDC-262 muestra congelada 1

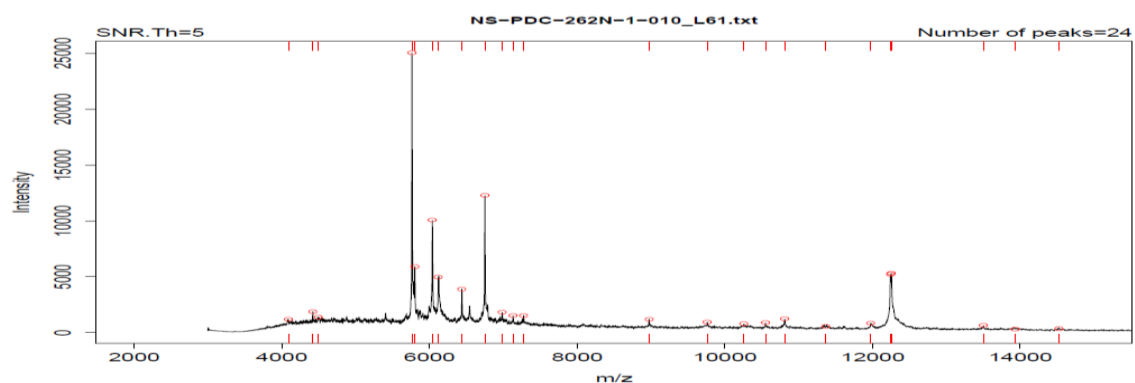


Figura 398. Espectro de masas cepa NS-PDC-262 muestra congelada 2

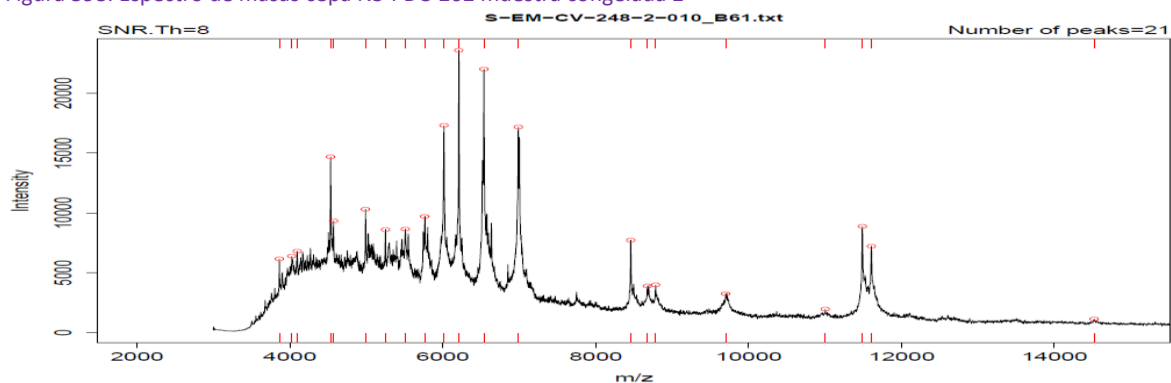


Figura 399. Espectro de masas de librería cepa NS-PDC-248, 1ª identificación en análisis de NS-PDC-262 nuevo crecimiento

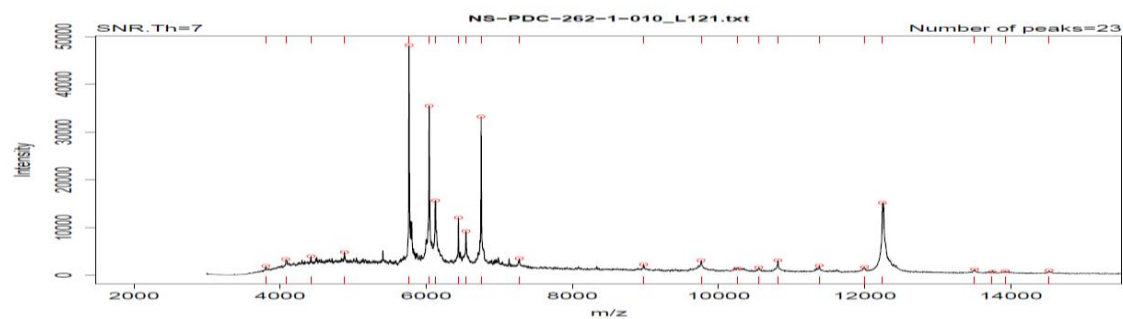


Figura 400. Espectro de masas de librería cepa NS-PDC-262